

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Proteínas nucleolares terminadoras de la replicación del rDNA y de la
transcripción de los genes Rrna**

papel en el control del ciclo celular y en la respuesta al estrés nutricional

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Rodríguez López

Director

Pablo Hernández Valenzuela

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Proteínas nucleolares terminadoras de la replicación del
rDNA y de la transcripción de los genes rRNA: papel en el
control del ciclo celular y en la respuesta al estrés
nutricional**

TESIS DOCTORAL

MARÍA RODRÍGUEZ LÓPEZ

Madrid, 2013

La presente tesis doctoral titulada: “Proteínas nucleolares terminadoras de la replicación del rDNA y de la transcripción de los genes rRNA: papel en el control del ciclo celular y en la respuesta al estrés nutricional”, ha sido realizada por María Rodríguez López, bajo la dirección del Dr Pablo Hernández Valenzuela, en el Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

María Rodríguez López
para optar al título de Doctor

VºBº del Director de Tesis

Dr. Pablo Hernández Valenzuela

Vº Bº de la Tutora de Tesis

Dra. Nieves Cuñado Rodríguez

Agradecimientos:

Bueno no sé ni por donde empezar, siempre supe que esta iba a ser la parte más complicada de escribir de la tesis. Como bien sabéis, a pesar de que hablo mucho, me cuesta poner mis sentimientos en palabras. Para mi habría sido mucho más sencillo expresar todo con un dibujo, pero voy a intentarlo.

¿Cómo poder agradecer a todo el mundo lo que ha hecho por mí estos últimos años? Hace casi 5 años cuando empecé la tesis ¿quién me iba a decir a mí que acabaría escribiendo esto desde mi nueva casa en Londres mientras pienso en dónde llevar de excursión a la gente del Pombe meeting?.

Lo primero de todo es agradecer al Dr Pablo Hernandez por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. He aprendido mucho de ti, gracias a las buenas costumbres adquiridas durante mis años de tesis he conseguido mi primer trabajo de post-doc sin ser tan siquiera doc. Muchas gracias Pablo, sé que seguiremos en contacto y espero poder seguir colaborando con vosotros durante los próximos años, hemos abierto las puertas a mucho futuro trabajo. También deseo agradecer al Dr Bernardo Schwartzman y la Dra Débora Krimer por sus aportaciones a nuestro trabajo.

La siguiente persona a quien quiero darle las gracias es a Marisa, mi compañera de laboratorio, la que siempre me escucha. Echo de menos nuestras charletas. Gracias por estar ahí, preocuparte por mí y apoyarme tanto, sobretodo en los últimos tiempos. Sabes que el laboratorio no va a ser lo mismo sin ti.

No quiero olvidarme de mis compañeros del Puerta de Hierro, no estuve mucho tiempo con vosotros pero siempre os voy a recordar; aprendí mucho de Marta y Ángel. Sabéis que siempre vais a tener un hueco en mi corazón, lo mejor que me llevé del hospital fue vuestra amistad. También quiero recordar el tiempo con Vanesa y David (nunca se me olvidarán las perfusiones a horas intempestivas). A Ana, mi "nueva yo", con quien nunca coincidí pero siempre que nos vimos me trató como si fuese una más.

Cuando llegue al CIB en mis primeras dos semanas tuvimos 2 tesis: la de Marijo, con la que no pude compartir mucho tiempo, espero que volvamos a coincidir y que pueda conocer a la nueva incorporación de tu familia, y la de "Martita", la primera de las tesis a las que asistí con su superenrollamiento negativo nativo. En el poco tiempo que coincidimos en el labo empezó a forjarse nuestra amistad. Sabes que nunca te librarás de mí, que en vez de unas líneas debería de escribirte un libro entero. Gracias por hacerme parte de tu familia, gracias a Edu, a tus padres y a tu hermana por "adoptarme". Algún día iré a Redi como te prometí.

Gracias a Leo y Javi, mis "rescatadores". Hemos compartido momentos muy divertidos y algunos no tanto, sé que siempre tendré un huequito en vuestra casa para refugiarme.

Mi primera profesora en el labo fue nuestra postdoc Zaira, gracias por enseñarme a "andar" en el laboratorio, aprendí mucho de ti. Espero que todo te vaya genial.

Que decir de mi pequeña Maria T, de tu constancia, entusiasmo y buen hacer he aprendido mucho. Compartimos muchos momentos en tu última etapa en el CIB y después en mi estancia en Reino Unido hiciste que los fines fuesen mucho más entretenidos. Se que te va a ir muy bien, no todos los días uno se encuentra a alguien a quien le emocione tanto su trabajo.

Estefanía, mi compi, empezamos a la vez ¿Cómo imaginarnos que íbamos a estar tu en Suiza con tu bebé y yo en Londres? Te deseo lo mejor.

Cuando volví al CIB después de mi paso por el hospital comenzó Vir, nuestra asturianita. Ahora que estas en París solo nos separa un tren, así que pronto recibirás una visita. Muchas gracias por quererme, los días en el labo no habrían estado completos sin tu compañía. Eres otro gran ejemplo de perseverancia.

En esta última etapa las nuevas incorporaciones han sido fichajes estrella. Como agradecer a Jorge todo lo que está haciendo por mi, sin ti nunca habría podido leer la tesis. Como diría Martita, eres un Sol. Gracias por toda tu ayuda y por tu gran entusiasmo en la realización de todas nuestras actividades "extraescolares", creo que he encontrado un buen sustituto :).

En mi intento de enseñar a las nuevas generaciones he creado a un "monstruito", Joaquín. Espero que consigas encontrar la forma de hacer el doctorado, eres de las pocas personas que sigue convencida en empezarlo a pesar de la situación tan mala en la que nos encontramos. Ten por seguro que tengo muchos experimentos para que hagas. Gracias por continuar con mi trabajo.

A los "Patricios" tengo que dedicarles un agradecimiento especial. Gracias por nuestros cafés terapia de principios de año. Eva, eres un remanso de paz, hablar contigo siempre me ha ayudado a mantener mi lado positivo. Cris, voy a echar mucho de menos esa química especial que tenemos. Gracias por tu locura.

Bea y Gonzalo, para cuando lea la tesis ya estaréis en Reino Unido conmigo. Se que vamos a seguir pasando muy buenos momentos. Me alegro de que nuestra aventura de post-doc empiece en el mismo sitio.

También quisiera recordar a Bea G y a Yoli que dejaron el CIB hace tiempo, y a todos los "adjuntos" de mis compañeros del CIB: Javi, Pinar, Edu, Gus, Pablo, Gonzalo ... aunque no nos veamos demasiado siempre formaréis parte de la gran FAMILIA DEL CIB.

To all the people at Bühler Lab, I really enjoyed my stay here in 2011 and I am sure that during next years you will become my new family. I want to specially thank Dr Bühler for giving me the opportunity to start this new stage of my professional life at his lab.

Hace 10 años empecé a estudiar en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV y conocía algunas de las mejores personas sobre la faz de la tierra. Mis Biologuillos, a vosotros si que no sé como daros las gracias. Siempre he sabido que me queráis, pero estos últimos meses habéis sido un apoyo sin el cuál no habría podido seguir adelante. Gracias a Leire, Dani, Peña, Raul, Guillermo, Oihana y Rubén. Lleváis mucho tiempo sufriendome y espero que sigáis ahí siempre. En especial tengo que agradecer a mi piltrafilla preferida, Lei. Sabes que eres parte de mi familia.

Espero que tu post-doc sea en Londres, me gustaría tenerte cerquita. Y a Dani, tenerte en Madrid ha sido de gran ayuda y que tus horarios sean tan raros me ha venido muy bien en las noches de insomnio, algún día iremos a un gran concierto y diremos con orgullo que el batería es nuestro amigo ;).

A todos mis amigos de fuera de la ciencia, Eva, Diego y mi "sobri" Unax, a Mar, a Johana, Yanire, Ali y Alberto (Bruto), Endika, Juanan, Lucia hay tanta gente.

Por último pero no por ello menos importante quisiera agradecer a mi familia, a mis padres que aunque siempre pensaron que debía de haber estudiado arquitectura, se han dado cuenta de que la ciencia siempre ha sido mi pasión y ahora confían en que llegaré muy lejos (espero no decepcionarles), a mi hermana que dice que cuando reciba el Nobel me construirá una casa (creo que nunca tendré esa casa ;). A mis dos perras Lucky y Bala por acompañarme en las largas noches de estudio.

El arte y la música siempre me han acompañado y hay una estrofa de una canción de Saurom que define perfectamente el proceso de realización de la tesis (en realidad de cualquier cosa de la vida):

"Las estatuas surgen de la dura y fría roca solo a base de martillo y cincel"

SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	10
Schizosaccharomyces pombe como organismo modelo	11
Ciclo celular de Schizosaccharomyces pombe	13
Regulación del ciclo por medio de la quinasa Cdc2 dependiente de ciclina	14
Complejo MBF: regulación de la entrada en replicación	19
El DNA ribosómico y las proteínas de la familia Myb.	21
El rDNA de mamíferos	24
El rDNA de Saccharomyces cerevisiae	24
El rDNA de Schizosaccharomyces pombe	26
OBJETIVOS	29
RESULTADOS	31
Reb1 participa en la regulación del ciclo celular	32
Las células reb1Δ son deficientes en el apareamiento y en la parada en G1 inducida por ayuno de nitrógeno	32
Reb1 regula la expresión de ste9+ en condiciones de ayuno de nitrógeno	33
La expresión periódica de ste9+ no está regulada por Reb1	38
Reb1 actúa como regulador de la fase G1 en ausencia de estrés nutricional: interacciones genéticas	39
Reb1 es necesaria para la reentrada de las células en proliferación desde G0	48
Caracterización de la proteína Reb1	57
Reb1 presenta varias isoformas y se procesa durante el ayuno de nitrógeno	57
La expresión ectópica de las isoformas A y B revierte los fenotipos de las células reb1Δ	66
Reb1 interacciona con otras proteínas	69
Implicaciones de Reb1 en otros tipos de estrés celular	75
Estudios Genome-wide de Reb1	80
Estudio de los sitios de unión de Reb1 en el genoma de S.pombe: Chip-seq	81
Reb1 podría estar regulando genes involucrados varios procesos biológicos	91
En el genoma de S. pombe existen otros posibles sitios de unión de Reb1	92
Estudio de la región del rDNA de S. pombe	93
La unión de Reb1 a alguno de estos promotores actúa como barrera para la replicación	94

Estudio de la expresión génica durante el ayuno de nitrógeno en una estirpe reb1Δ mediante microarrays de expresión	99
DISCUSIÓN	115
La proteína Reb1 de Schizosaccharomyces pombe es una proteína multifuncional	116
Reb1 se une preferentemente a regiones reguladoras de los genes	117
Reb1 se une al origen de replicación del rDNA	118
Reb1 participa en la respuesta transcripcional durante el ayuno de nitrógeno	119
El procesamiento de Reb1 podría actuar como activador de su función como regulador transcripcional positivo	121
Reb1 podría participar en la localización nuclear de los genes que regula	122
Modelo de regulación transcripcional en respuesta al ayuno de nitrógeno mediada por Reb1	126
Reb1 podría interaccionar con la histona demetilasa Lsd1 favoreciendo el bloqueo de las horquillas replicativas en el rDNA	127
La proteína Reb1 de Schizosaccharomyces pombe es necesaria para la supervivencia durante el estado de quiescencia derivado de la saturación en MM	134
Las células reb1Δ presentan un envejecimiento replicativo deficiente en MM	134
CONCLUSIONES	143
MATERIALES Y MÉTODOS	146
Material biológico: cepas y plásmidos	147
Cepas de S. pombe	147
Cepas de E. coli	149
Plásmidos	149
Medios de cultivo	151
Medios de cultivo de S. pombe	151
Medios de cultivo bacterianos	152
Condiciones de cultivo	152
Cultivo de S. pombe	152
Técnicas experimentales	153
Transformación celular	153
FACS, análisis de muestras mediante citometría de flujo	153
Extracción de DNA de S. pombe	154
Extracción de RNA de S. pombe	155
Extracción de proteínas	160

ChIP- seq	162
Otras técnicas	164
BIBLIOGRAFÍA	165
ANEXOS	175

ABREVIATURAS:

Ade	Adenina
AMPc	AMP ciclico
ARS	Autonomous replicating sequence (secuencia de replicación autónoma)
BCA	Ácido Bicinconínico
cDNA	ADNA complementario
CLS	Chronological life span (envejecimiento cronológico)
DNA	Ácido Desoxirribonucleíco
DTT	Ditiotreitol
ERCs	Extracromosomal rDNA circles (círculos extracromosómicos de rDNA)
FACS	Fluorescent activated cell sorting. Citometría de flujo
His	Histidina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MM	Medio mínimo
MM - N	Medio mínimo sin nitrógeno
nmt	No message in thiamine
NOR	Nucleolous organizer regions. Regiones organizadoras nucleolares.
OD	Densidad óptica
Oligo	Oligonucleótido, cebador
ORF	Open Reading Frame (marco abierto de lectura)
Pb	Pares de bases
rDNA	DNA ribosomal
RFB	Replication Fork Barrier (Barrera para las horquillas replicativas)
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
Rpm	Revoluciones por minuto
TSS	Transcription start site (sitio de inicio de la transcripción)
TTS	Transcription termination site (sitio de finalización de la transcripción)
Ura	Uracilo
UTR	Un-Translated Region (región no codificante)
YES	Yeast Extract Supplemented (medio rico)

1.

SUMMARY

SUMMARY

Making use of the multiple molecular techniques available in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, we have been able to characterize a new function for the Reb1 protein acting as a transcriptional regulator for genes involved in the stress response to nitrogen starvation. We have also found that this protein becomes essential when cells need to lengthen their G1 phase either due to a defect on the proteins required for passing through “start” or due to the need of reaching a certain size to passage through start. Reb1 is also needed for the survival upon entry into stationary phase in minimal medium.

The ribosomal genes are usually organized as one or several arrays of tandemly repeated copies through the genome. In *S. pombe*, the rDNA consists of about 125 copies arranged in two arrays at both ends of chromosome III. A common feature observed in most organisms is that rDNA is replicated almost entirely in a unidirectional manner, with replication forks moving through the transcribed region in the direction of transcription. This is achieved by the presence of replication fork barriers (RFBs) located downstream the transcriptional units. It is believed that these RFBs serve as a mean to prevent the head on collision between replication and transcriptional machineries due to the high transcriptional rate of these genes even during DNA replication. In the fission yeast, three RFBs (RFB1-3) have been identified. A fourth replication fork pause (RFP4) can be visualized when any of the other barriers is not functional. All of *S. pombe*'s RFBs are dependent on the presence of the protein complex Swi1-Swi3. The RFB1, the one that gives the strongest signal and the closest one to the replication origin, is dependent on the presence of the switch activating protein Sap1 (Mejía-Ramírez et al., 2005). Reb1 is the protein that induces replication fork arrest at barriers RFB2 and RFB3, upon binding to two specific 17-bp sites (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004). Binding of Reb1 to these two sites is also required for the termination of rRNA transcription by RNA polymerase I (Zhao et al., 1997).

SUMMARY

In this study we have found that Reb1 also binds *in vivo* and *in vitro* to a sequence upstream the promoter of the gene *ste9⁺*, participating in its up-regulation under nitrogen starvation (Rodríguez-Sánchez et al., 2011). Ste9 cooperates in the arrest of cells in G1 in response to nutritional stress. This is achieved by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), which targets B-type cyclin for proteasome (Blanco et al., 2000).

G1 arrest enables cells to proceed through sexual differentiation, mating and spore formation to resist the harsh environment. Cells lacking Reb1 show a reduced arrest in G1 leading to a diminished fertility (Rodríguez-Sánchez et al., 2011) due to the inefficient expression of *ste9⁺* during nitrogen deprivation.

In addition to its function in the regulation of the G1 phase during nitrogen deprivation, we have also found that Reb1 becomes essential for viability when cells need to lengthen the G1 phase to reach the minimal size to begin replication, as in the thermosensitive *wee1-50* mutant. The fission yeast shows a smart design to control the accurate size in which cells are born. This involves a mechanism based on gradients of inhibitory kinases, that in the last step regulate the activity of Cdc2, the only cyclin dependent kinase required in this yeast to drive the cell cycle. Wee1 is a kinase that phosphorylates Cdc2 (keeping the Cdc2-Cdc13 inactive) during G2 phase to prevent the premature entrance into mitosis if the cells have not reached the critical size for entering this phase. The combined *reb1Δ wee1-50* mutants die of mitotic disaster after a couple of rounds of premature entrance into replication and mitosis.

Reb1 is also essential for the viability of cells with defects in proteins required for the initiation of S-phase, as in *cdc10-129* mutants. Cdc10 is a component of the transcriptional regulator complex MBF (Aligianni et al., 2009; Caetano et al., 2011), involved in controlling that the expression of the genes necessary for the entry into the S takes place only during G1

SUMMARY

phase (McInerny et al., 1995). These data indicate that Reb1 is required to prevent the premature passage of cells through *start*.

We have also found that during the course of the quiescent state induced upon reaching stationary phase on minimal medium, *reb1Δ* cells lose their viability at the early stages of stationary phase, showing a reduced chronological life span.

Reb1 protein presents two Myb-type domains required for DNA binding. A protein interaction domain at its N-terminal end allows Reb1 to dimerize and interact with other proteins (Biswas and Bastia, 2008). We have found that during nitrogen starvation, Reb1 is processed through this N-terminal domain in a specific pattern, giving rise to different isoforms. The pattern of Reb1 isoforms is specific of the culture medium in which cells are growing. These different isoforms might be involved in the various cellular responses that we have attributed to Reb1. The exogenous expression of two of this isoforms is able to carry out all the Reb1 functions described above.

Our latest work is centered on a high-throughput screening for other Reb1 binding sites on the fission yeast's genome. This study has revealed that Reb1 binds upstream various genes, frequently around their transcription start sites. The gene ontology enrichment (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012) of the genes whose promoters Reb1 binds to, shows that Reb1 might be involved in the transcriptional regulation of genes that participate in the regulation of cell cycle (e.g., *ste9*, *nim1*, *cig2*, *rbx1*, *cdc18*), in the biosynthesis of secondary metabolites (e.g., *fbp1*, *pgk1*, *gpm1*) and in the ubiquitin mediated degradation of proteins (*cyp8*, *ste9* and *rbx1*). Using real-time RT-PCR technique, we have been able to show that Reb1 is required for the transcriptional regulation of some of these genes in response to nitrogen starvation. The expression of genes *nim1+*, *ste9+*, *cdc18+* and *cig2+*, is known to be up-regulated during nitrogen starvation, diminished in *reb1Δ* cells.

SUMMARY

Preliminary microarray studies have shown that Reb1 might be controlling the expression of other genes that show no apparent binding site for this protein on their promoter. One of these genes is *ecf1+*, which is over expressed upon entry of cells into stationary phase or under nitrogen starvation. Cells that lack Reb1 show no transcriptional up-regulation of *ecf1+* upon entrance into stationary phase, nor upon nitrogen starvation. These results indicate that Reb1 acts as a transcriptional regulator protein for multiple genes in *S. pombe*.

All together, the results described above lead us to propose a model in which Reb1 acts as a scaffold protein that tethers together different genomic regions (by dimerization or binding to other DNA binding proteins) (Singh et al., 2010) during non stressful conditions close to the nucleolus, where the stress response genes are silenced or expressed at baseline level. Upon sensing the absence of nitrogen, the protein interaction N-terminal domain of Reb1 is readily processed allowing the movement of the silenced chromosomal regions to a more transcription prone zone of the nucleoplasm. Processing of the N-terminal domain would not only allow the release of the Reb1-binding *loci* from the silenced nuclear zone, but it could also serve to activate the pro-transcriptional properties of Reb1. As the cells are kept under nitrogen starvation, Reb1 is further processed, switching off the transcription of the early Reb1-dependent nitrogen response genes.

In the present work we have shown that Reb1 is a multifunctional protein acting in the regulation of several cellular processes in fission yeast, such as replication, transcription and stress response.

SUMMARY

Bibliography:

- Aligianni, S., Lackner, D.H., Klier, S., Rustici, G., Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Codlin, S., Brazma, A., de Bruin, R.A., and Bahler, J. (2009). The fission yeast homeodomain protein Yox1p binds to MBF and confines MBF-dependent cell-cycle transcription to G1-S via negative feedback. *PLoS Genet* 5, e1000626.
- Biswas, S., and Bastia, D. (2008). Mechanistic Insights into Replication Termination as Revealed by Investigations of the Reb1-Ter3 Complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 28, 6844-6857.
- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* 19, 3945-3955.
- Caetano, C., Klier, S., and de Bruin, R.A. (2011). Phosphorylation of the MBF repressor Yox1p by the DNA replication checkpoint keeps the G1/S cell-cycle transcriptional program active. *PLoS One* 6, e17211.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 8, R3.
- McInerny, C.J., Kersey, P.J., Creanor, J., and Fantes, P.A. (1995). Positive and negative roles for cdc10 in cell cycle gene expression. *Nucleic Acids Res* 23, 4761-4768.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* 37, W317-322.
- Rodríguez-Sánchez, L., Rodríguez-López, M., Garcia, Z., Tenorio-Gómez, M., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (2011). The fission yeast rDNA-binding protein Reb1 regulates G1 phase under nutritional stress. *J Cell Sci* 124, 25-34.
- Sánchez-Gorostiaga, A., López-Estraño, C., Krimer, D.B., Schvartzman, J.B., and Hernández, P. (2004). Transcription termination factor reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo. *Mol Cell Biol* 24, 398-406.
- Singh, S.K., Sabatinos, S., Forsburg, S., and Bastia, D. (2010). Regulation of Replication Termination by Reb1 Protein-Mediated Action at a Distance. *CELL* 142, 868-878.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 40, W478-483.
- Zhao, A., Guo, A., Liu, Z., and Pape, L. (1997). Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Reb1p: sequence-specific recognition of two sites in the far upstream rDNA intergenic spacer. *Nucleic Acids Res* 25, 904-910.

2.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

2.1. *Schizosaccharomyces pombe* como organismo modelo

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, es un hongo ascomiceto unicelular de forma alargada y cilíndrica. Esta levadura presenta un ciclo biológico sencillo (Figura 1) que consiste en una reproducción mitótica vegetativa, preferentemente en forma haploide, dividiéndose por fisión medial cada 2-4 horas. Cuando las condiciones ambientales son adversas, especialmente al sufrir una reducción de la fuente de nitrógeno, estas levaduras conjugan en parejas de células de tipo de apareamiento contrario, experimentan cariogamia y el cigoto resultante desarrolla una meiosis convencional que da lugar a un asca con cuatro esporas. Las esporas constituyen formas de resistencia, permaneciendo de forma latente hasta que las condiciones de ambientales son adecuadas para germinar y entrar en ciclo vegetativo de nuevo.

Las estirpes silvestres de *S. pombe* son homotáticas (h^{90}), es decir, pueden conjugarse entre ellas puesto que en la población están presentes los dos tipos de apareamiento (P, de *plus*, y M, de *minus*). Esto es debido a que durante las divisiones mitóticas se producen cambios frecuentes del tipo de apareamiento de las células (de P a M, y viceversa). Por conveniencia, a menudo se utilizan en el laboratorio estirpes heterotáticas (h^+ o h^-) (Gutz and Doe, 1973; Willer et al., 1995; Xiang et al., 2000) que son incapaces de cambiar de tipo de apareamiento y, por tanto, no se produce conjugación dentro de la población celular. Debido a esta condición, cuando las células heterotáticas se encuentran bajo condiciones ambientales adversas entran en un estado de latencia o quiescencia G0 durante un largo periodo de tiempo, que representa otra forma de resistencia hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables (Klosinska et al., 2011; Yanagida, 2009)(Figura 1).

Su fácil crecimiento en el laboratorio junto con la disponibilidad de técnicas genéticas sencillas y la secuenciación completa del genoma (Wood et al., 2002) permitieron que este microorganismo se convirtiese, durante el siglo pasado, en un excelente modelo para estudios

INTRODUCCIÓN

tanto de biología celular como molecular (Forsburg, 2005).

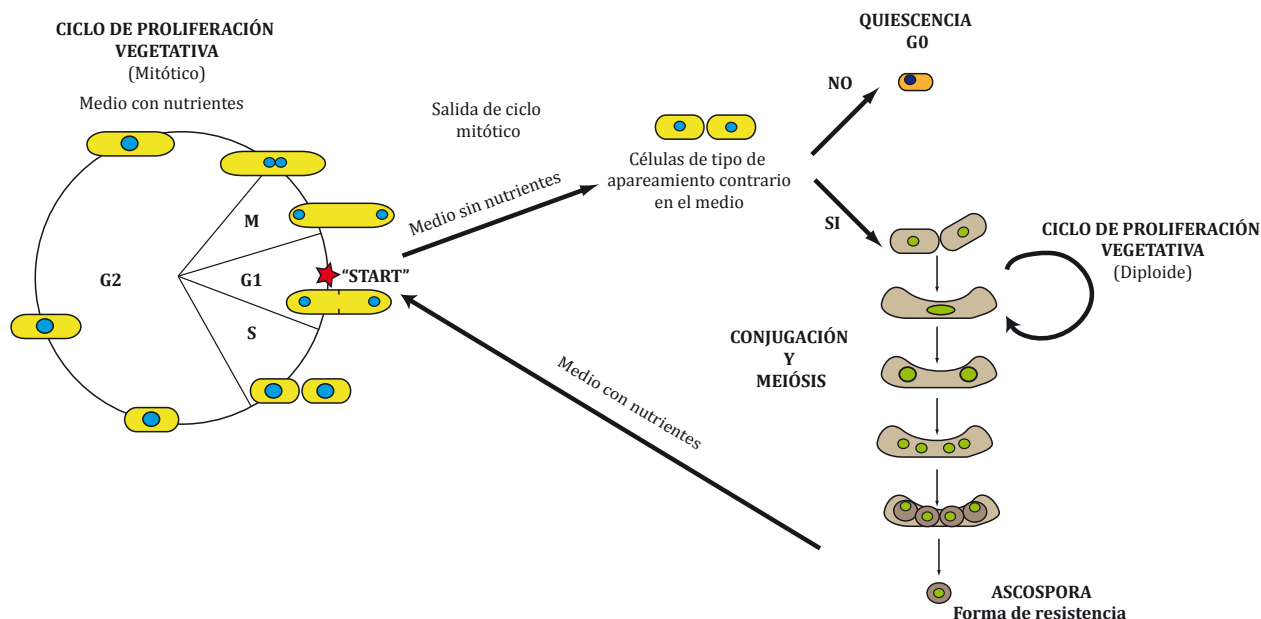


Figura 1. Ciclo biológico de *S. pombe*.

Esta levadura se aisló en 1890 a partir de cerveza de mijo africana, pero la mayoría de las estirpes de uso en el laboratorio derivan de aislados europeos de los años 20 del siglo pasado. Las primeras caracterizaciones genéticas las realizó en la década de los 40 Urs Leupold. A partir de los años 50 comenzaron los estudios de ciclo celular con *S. pombe*, siendo estos de tal relevancia que llevaron a la concesión del premio Nobel a Paul Nurse por sus estudios sobre las quinasas dependientes de ciclinas.

En contraste con la otra levadura ampliamente usada como organismo modelo, la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe* comparte ciertas características con los metazoos que la hacen idónea para su uso como modelo. Su genoma de unas 13,9 Mb se encuentra distribuido en solo tres cromosomas relativamente grandes (cromosoma I de 5,6 Mb; cromosoma II de 4,5 Mb y cromosoma III de 3,8 Mb) más el genoma mitocondrial (Wood et al., 2002). La estructura de estos cromosomas se asemeja a los de los eucariotas superiores, con centrómeros heterocromáticos extensos (~40-100kb) compuestos de numerosas

INTRODUCCIÓN

repeticiones simples, estructura similar a la descrita para *Drosophila* y orígenes de replicación de mayor tamaño y difusos (~1 kb) que en la levadura de gemación. Proporcionalmente, contiene más genes conservados con los metazoos que *S. cerevisiae* y más del 40% contienen intrones, generalmente en número bajo y de pequeño tamaño. Asimismo, los mecanismos de reparación de DNA y de *splicing* del RNA se asemejan más a las células de mamíferos, disponiendo además de mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNAi (Hansen et al., 2005; Woolcock et al., 2012).

2.2. Ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*

El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por una fase premitótica G2 larga, que constituye alrededor del 70% de todo el ciclo, con lo que el resto de las fases (G1, S y M), ocupan sólo el ~10% cada una (Gomez and Forsburg, 2004). Otra característica peculiar de ciclo de esta levadura es que la citocinesis no ocurre inmediatamente después de la división del núcleo al final de la mitosis, sino que tras la cariocinesis, la célula discurre por G1 y gran parte de la fase S como binucleada, produciéndose la citocinesis al final de la replicación del DNA (Figura 1). Como consecuencia de estas dos características, al analizar mediante citometría de flujo (FACS) el contenido de DNA de las células en un cultivo en proliferación, vemos que la mayoría tienen un contenido 2C a pesar de ser células haploides. Cuando las células se detienen en la fase G1, como sucede en el caso de algunos tipos de restricción nutricional y en ciertos mutantes de ciclo celular, la célula binucleada realiza la citocinesis dando lugar a dos células haploides (contenido 1C en FACS) que puede diferenciarse y entrar, de manera independiente en ciclo meiótico.

Un momento crítico del ciclo celular se da en la transición G1/S denominada “*Start*” o “inicio” en levaduras (Hartwell et al., 1974) y “punto de restricción” en mamíferos (Pardee, 1974). Es

INTRODUCCIÓN

en ese momento cuando la célula determina si continúa con su proliferación volviendo a replicar su DNA para dividirse o si, por el contrario, abandona el estado proliferativo. Las células en proliferación de *S. pombe* tienen dos mecanismos alternativos para salir del ciclo de división mitótica en respuesta a condiciones de estrés ambiental: entrar en una fase estacionaria durmiente (G0) o, tras la mitosis, diferenciarse en ascosporas.

Estados de privación nutricional, tales como la ausencia de fuente de nitrógeno en el medio, inducen el cese de la proliferación y la parada de las células en G1 (Costello et al., 1986). Las células solo pueden iniciar la conjugación si se detienen en G1 en un momento antes de alcanzar el punto de inicio, llamado *pre-start*. Una vez pasado éste, las células están determinadas a completar su replicación y división. El factor transcripcional Ste11 es el principal responsable de la activación de los genes necesarios para llevar a cabo el cambio de ciclo proliferativo mitótico a la diferenciación sexual (Otsubo and Yamamoto, 2012). La expresión de este factor es consecuencia de la activación de cuatro rutas de señalización importantes: ruta del AMPc, ruta TORC1 y las rutas MAPK dependientes de feromonas y de estrés).

2.2.1. Regulación del ciclo por medio de la quinasa Cdc2 dependiente de ciclina

En *S. pombe*, la combinación de una única quinasa dependiente de ciclina (CDK, *cyclin dependent kinase*), Cdc2, junto con su subunidad reguladora Cdc13 es capaz de controlar la alternancia ordenada entre las fases de síntesis de DNA y de mitosis (Coudreuse and Nurse, 2010; Sveiczer et al., 2000; Tyson et al., 2002; Tyson and Novak, 2011) formando el complejo Cdc2-Cdc13 también denominado MPF (*M-phase promoting factor*). En esta levadura existen además otras tres ciclinas encargadas de la regulación fina de la transición G1/S denominadas ciclinas “*starter*”: Cig1, Cig2 y Puc1.

El ciclo celular de *S. pombe* se regula por una compleja red de mecanismos de retroalimentación (Figura 2). El complejo MPF promueve su propia activación por medio de la

INTRODUCCIÓN

fosforilación de sus represores, que los inactiva o bien los marca para su degradación, y por la fosforilación que activa a sus activadores (como Cdc25).

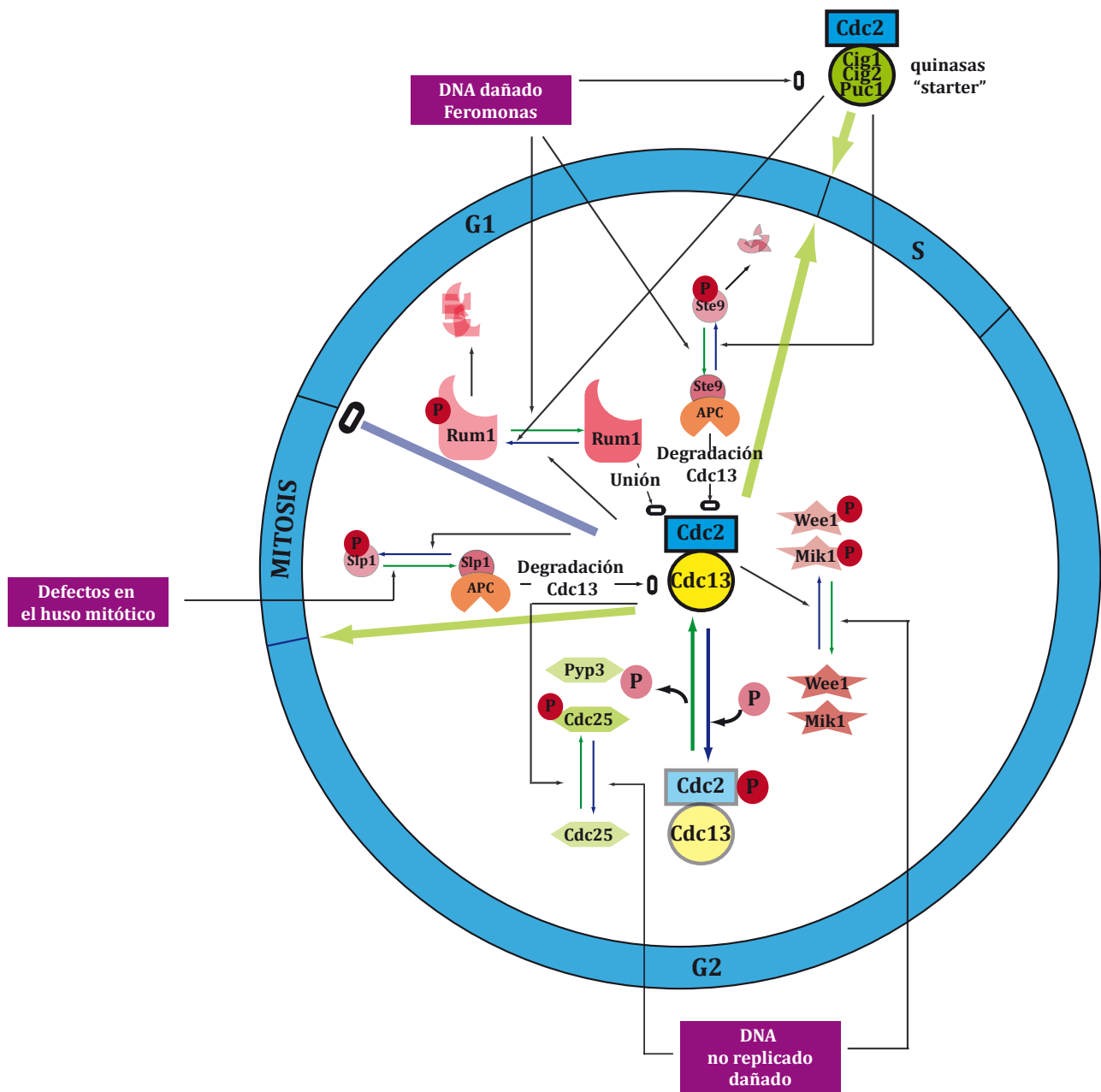


Figura 2. Esquema del papel de las proteínas principales que intervienen en la regulación del ciclo celular de *S. pombe* (modificado de Tyson et al., 2002).

2.2.1.1. Regulación del complejo ciclina-CDK

La periodicidad correcta del ciclo se asegura variando la actividad quinsa del complejo MPF durante las distintas fases del mismo (Sveiczer et al., 2000; Tyson and Novak, 2011) (Figura 3).

INTRODUCCIÓN

Durante G1 los niveles de actividad quinasa han de ser bajos para permitir el licenciamiento de orígenes de replicación. Según se va progresando en G1 la actividad ha de aumentar lo necesario como para posibilitar el inicio de la replicación. Una vez la célula se encuentra en G2 los niveles de actividad CDK se mantienen relativamente bajos hasta que la célula alcanza el tamaño mínimo para entrar en mitosis, momento en el que los niveles de actividad quinasa han de ser máximos para comenzar la mitosis. Finalmente, los niveles de actividad CDK han de caer para la salida de mitosis y entrar de nuevo en G1 (Figura 3).

Mientras que los niveles de la proteína Cdc13 varían a lo largo del ciclo, la proteína Cdc2 mantiene sus niveles constantes. La actividad quinasa del complejo Cdc2-Cdc13 se puede regular de tres modos (Tyson et al., 2002):

- 1) Mediante la disponibilidad de la ciclina, cuya inactivación ocurre por ubiquitinación y proteólisis (Blanco et al., 2000; Kominami et al., 1998).
- 2) Por el estado de fosforilación de la subunidad quinasa del complejo, que es regulado por las quinasas Wee1 y Mik1, y por la fosfatasa Cdc25, (Lee et al., 1994; Lundgren et al., 1991; Russell and Nurse, 1987).
- 3) Por la unión de inhibidores estequiométricos como Rum1 (Martin-Castellanos and Moreno, 1996; Moreno et al., 1994; Moreno and Nurse, 1994) (Figura 2).

2.2.1.1.1. Regulación de la actividad quinasa en G1/S.

Como ya hemos mencionado, durante G1 la actividad quinasa del complejo Cdc2-Cdc13 ha de ser reducida. Los niveles de Cdc13 se mantienen bajos en esta fase gracias a la proteína Ste9, que se une a APC (*Anaphase Promoting Complex*) y lo activa (juntas forma el complejo APC^{Ste9}) promoviendo la ubiquitinación de Cdc13, que de este modo es marcada en para su degradación por el proteasoma (Blanco et al., 2000). Asimismo, la unión de Rum1 a Cdc13 inhibe alostéricamente al complejo Cdc2-Cdc13 (Correa-Bordes and Nurse, 1995).

INTRODUCCIÓN

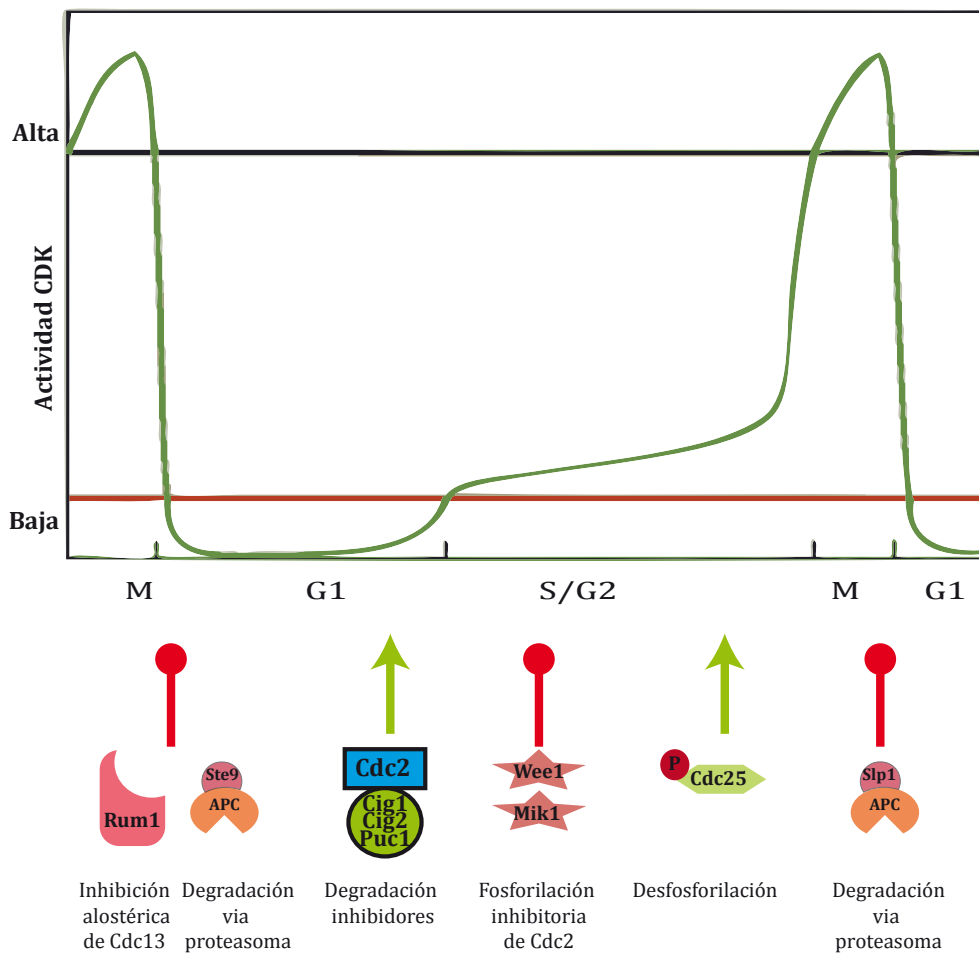


Figura 3. Niveles de actividad Cdk a lo largo del ciclo celular de *S. pombe* (modificado de Tyson and Novak, 2011). Esquema que muestra los niveles de actividad CDK con los umbrales que marcan el paso a las distintas fases del ciclo. Asimismo, se señalan algunas de las proteínas involucradas en la regulación de esta actividad.

La entrada en la fase S de replicación del DNA está mediada por la acción de las “quinasas starter”, formadas por la unión de una de las ciclinas Cig1, Cig2 y Puc1 con Cdc2 (Martin-Castellanos et al., 2000; Martin-Castellanos et al., 1996), siendo estos complejos menos sensibles a la acción de Ste9 y Rum1. Estas quinasas fosforilan a Ste9 y a Rum1 marcándolas para su degradación. Como consecuencia de la degradación de sus inhibidores, los niveles de Cdc13 aumentan y la actividad quinasas es suficiente para permitir la replicación.

La actividad de la kinasa Mik1 no es esencial para llevar a cabo un ciclo normal, pero si se

INTRODUCCIÓN

activa el *checkpoint* replicativo durante la fase de replicación, Mik1 es sobreexpresada (Rhind and Russell, 2001) colaborando así a prevenir el paso prematuro a mitosis antes de que la replicación haya terminado.

2.2.1.1.2. Regulación de CDK en G2/M

Durante las fases S y G2, los niveles de Cdc2-Cdc13 son intermedios, pero la actividad quinasa de Cdc2 se encuentra reprimida para evitar una entrada prematura en mitosis. Las quinasas Wee1 y Mik1 (Lee et al., 1994; Russell and Nurse, 1987) son las encargadas de esta represión fosforilando el residuo Tyr-15 de Cdc2. La eliminación de estas dos quinasas lleva a las células a una catástrofe mitótica (Lundgren et al., 1991). En oposición a esta actividad quinasa, la fosfatasa Cdc25 es capaz de activar Cdc2 hacia el final de G2 mediante su desfosforilación.

Por lo tanto, para que la mitosis inicie, la actividad de Cdc25 ha de aumentar y disminuir la de Wee1 y Mik1, de manera que se incrementan los niveles de actividad quinasa del complejo Cdc2-Cdc13. Esta transición está promovida por el crecimiento de la célula hasta un tamaño crítico (Martin and (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009). Los niveles de expresión de Cdc25 son máximos justo antes de la entrada en mitosis. Es el propio complejo Cdc2-Cdc13 el que interviene en su activación, inhibiendo a Wee1 por fosforilación y activando Cdc25 por este mismo mecanismo. Este mecanismo de control de paso a los distintas fases del ciclo mediante umbrales de actividad CDK previene una re-replicación previa a la mitosis.

Finalmente, para la salida de mitosis, la actividad Cdc2-Cdc13 debe ser eliminada y Ste9 y Rum1 activadas. La degradación de Cdc13 está mediada de nuevo por su ubiquitinación a través del complejo APC^{Slp1}. Esto, además de promover la salida de mitosis, permite que Ste9 y Rum1 se activen manteniendo baja la actividad quinasa hasta el inicio de una nueva ronda de replicación del DNA

2.3. Complejo MBF: regulación de la entrada en replicación

El inicio de la replicación en *S. pombe* viene precedido por la expresión de una serie de genes promovida por el complejo regulador transcripcional MBF (*MCB binding factor*), que se une a unas secuencias definidas de DNA localizadas en los promotores, conocidas como MCB (*MluI cell-cycle boxes*). En mamíferos, la regulación de la expresión de estos genes está controlada por la familia de factores transcripcionales E2F. En *S. cerevisiae* la oleada de expresión génica que precede a la replicación está regulada por dos complejos, SBF y MBF, que comparten la misma subunidad reguladora Swi6 (Bastos de Oliveira et al., 2012; Wittenberg and Reed, 2005). SBF se une a las cajas SCB (*Swi4 cell-cycle box*) a través de la proteína Swi4, mientras que la unión de MBF a las secuencias MCB es mediada por la proteína Mbp1. Estos dos complejos se encargan principalmente de fomentar la expresión de los genes de las ciclinas necesarias para el paso por “start” y de los genes necesarios durante la fase S, respectivamente.

En *S. pombe*, el complejo MBF (Figura 4) se compone de un núcleo funcional formado por las proteínas de unión al DNA Res1 (Ayte et al., 1995) y Res2 y una subunidad esencial para la actividad transcripcional, Cdc10, que muestra una alta homología con Swi6 de *S. cerevisiae*. La actividad de este complejo está regulada por una serie de proteínas que actúan como co-activadoras o como co-represoras. Entre las co-activadoras está Rep2, encargada de que se alcancen niveles elevados de transcripción, pero no está involucrada en la regulación de la expresión a lo largo del ciclo. Entre los co-represores se conocen Nrm1 y Yox1, que se encargan de confinar la actividad transactivadora del complejo a momentos concretos del ciclo (Aligianni et al., 2009; Caetano et al., 2011). El complejo MBF no solo promueve la expresión de los genes necesarios para la entrada en S desde G1, sino que también actúa en se represión a lo largo del resto del ciclo (McInerney et al., 1995).

INTRODUCCIÓN

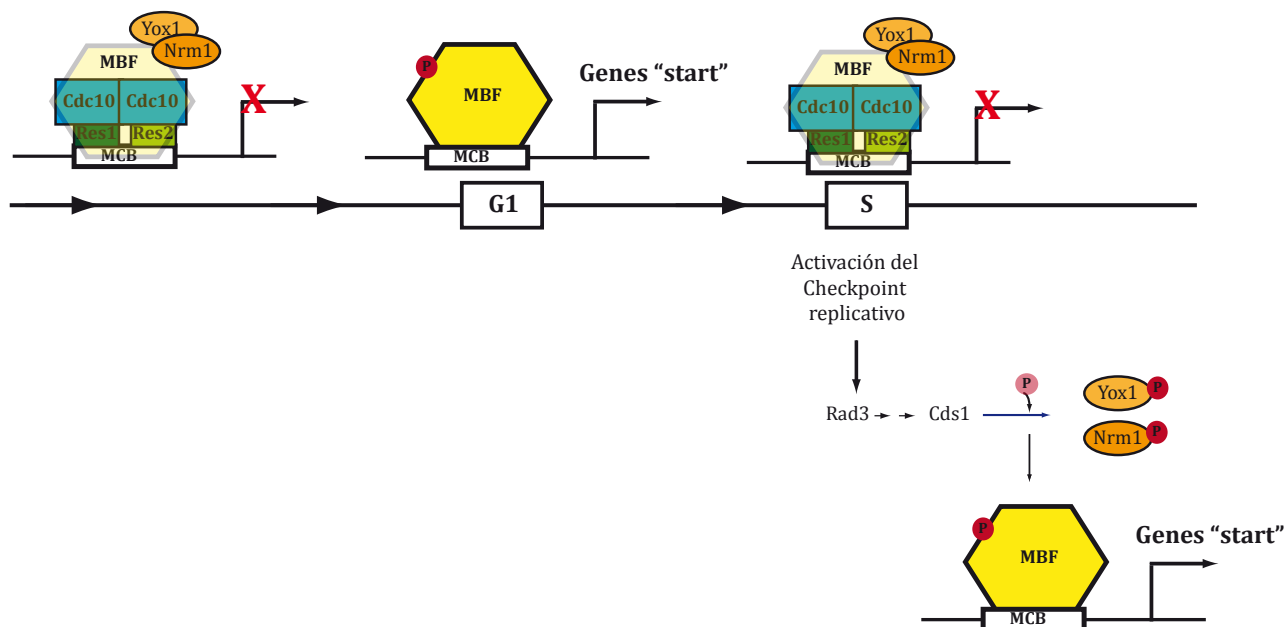


Figura 4. Complejo MBF. Esquema que representa algunos de los componentes del complejo MBF promotor de la expresión de genes necesarios para la entrada en replicación. Durante la fase G1 se disocian los inhibidores del complejo permitiendo la expresión de los genes necesarios para el paso por “start”.

Este complejo MBF es diana de la respuesta de *checkpoint* al daño en el DNA durante la replicación y al estrés replicativo inducido por HU. La quinasa efectora Cds1 (ortóloga de Rad53 de *S. cerevisiae* y de CHK2 de metazoos) fosforila los co-represores Nrm1 y Yox1 e impide su asociación a MBF. Esta activación de MBF hace que la expresión de los genes de fase S dependientes de este complejo permanezca activa hasta que el estrés desaparece (de Bruin et al., 2008; Gomez-Escoda et al., 2011).

Se conocen más de una veintena de posibles dianas de MBF, que se agrupan en distintas categorías funcionales. Estos genes contienen una o varias secuencias de unión de MBF en sus promotores. Los genes regulados por MBF más estudiados codifican para las siguientes proteínas: Cig2, ciclina tipo B específica de G1, que también regula al propio MBF por un mecanismo de retroalimentación negativa (Ayte et al., 2001); los factores de licenciamento

INTRODUCCIÓN

de orígenes Cdc18 (Baum et al., 1998) y Cdt1 (Hofmann and Beach, 1994); y Cdc22, subunidad mayor de la ribonucleótido reductasa (Maqbool et al., 2003). La llamada transcripción “start” de estos genes comienza ya al final de la mitosis, aunque durante esta fase las proteínas no son funcionales debido a la alta actividad CDK. Sus productos se van acumulando durante G1 hasta que se alcanzan los niveles necesarios para la entrada en replicación.

Se ha descrito, además, que las proteínas Cdc10, Res2, Rep1 y Rep2 del complejo MBF son necesarias para promover la expresión de los genes requeridos para la replicación premeiotica del DNA. Una distinta combinación de los componentes de MBF estaría determinando la transcripción de genes replicativos de la vía mitótica o de la meiótica. De hecho la proteína Rep1 es específica de meiosis mientras que Res1 no se requiere para esta vía (Cunliffe et al., 2004). Algunos de los grupos de genes regulados por MBF son comunes a ambas vías y parece el patrón de las secuencias MCB presentes en sus promotores podría determinar en cuál de las dos vías su transcripción es activada.

2.4. El DNA ribosómico y las proteínas de la familia Myb.

El DNA ribosómico o rDNA se caracteriza por su disposición en uno o varios *loci* del genoma en los que está organizado como una serie repeticiones en tándem, cada una de las cuales consta de una región que codifica el pre-rRNA, procesado a los rRNA 18S, 5,8S y 25-28S, y un espaciador intergénico (IGS). El número de *loci* y el número de repeticiones que compone cada *locus* depende de la especie. Las regiones del genoma donde se localiza el rDNA constituyen las regiones organizadoras del nucleolo o NOR (*nucleolous organizer regions*). El rDNA es transcrito por la RNA polimerasa I (Pol I) y en el espaciador intergénico se localizan

INTRODUCCIÓN

varios elementos reguladores de esta transcripción, así como de la replicación del rDNA.

Una característica del rDNA conservada en eucariotas es la presencia de barreras naturales para las horquillas replicativas, denominadas RFBs (de *replication fork barriers*), localizadas en el espaciador intergénico cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional. Estas RFB son de naturaleza polar, de modo que solo detienen las horquillas que se desplazan en el sentido contrario a la transcripción. Se cree que la función de estas barreras podría ser la de asegurar la replicación unidireccional del rDNA, de manera que ésta se dé principalmente en el mismo sentido que la transcripción, previniendo la colisión frontal entre los complejos replicativo y transcripcional. Se han localizado estas RFBs en el rDNA de todas las especies eucarióticas estudiadas, como levaduras (Brewer and Fangman, 1988; Kobayashi et al., 1992; Linskens and Huberman, 1988; Sánchez-Gorostiaga et al., 2004), plantas (Hernández et al., 1993; López-Estraño et al., 1999) y mamíferos (Little et al., 1993; López-Estraño et al., 1998).

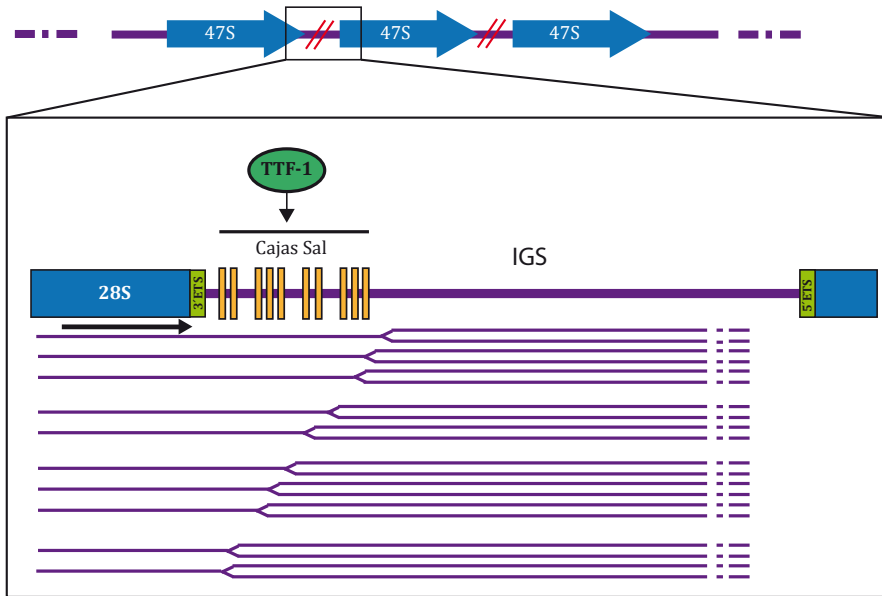
El mecanismo por el que se produce la terminación de la transcripción del rRNA por la Pol I no está bien establecido aun, aunque se conocen algunos elementos que parecen estar involucrados (Nemeth et al., 2013). Como característica general de la terminación por Pol I, ésta depende del reclutamiento de factores proteicos a secuencias específicas del rDNA. Uno de estos factores es una proteína de unión a DNA, conservada desde levaduras a mamíferos (Reb1 y TTF1, respectivamente), que se une a uno o varios sitios específicos de la región de terminación. La orientación de la secuencia de unión es esencial para que el complejo sea activo. La terminación ocurre a unos pocos nucleótidos del extremo 5' del sitio de unión de la proteína.

Estas proteínas del tipo Reb1, incluyendo Nsi1, recientemente identificada como requerida para la terminación en *S. cerevisiae* (Reiter et al., 2012), contienen uno o varios dominios de unión a DNA del tipo Myb.

INTRODUCCIÓN

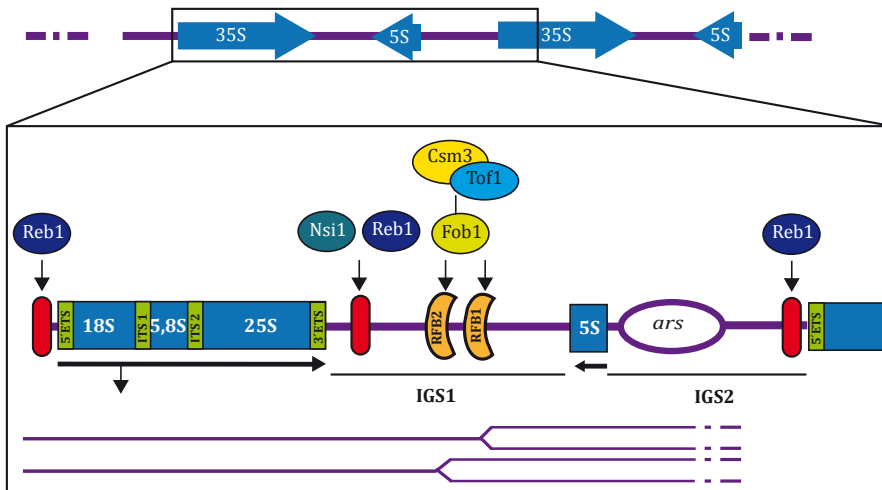
A

Mamíferos



B

S. cerevisiae



C

S. pombe

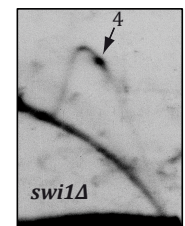
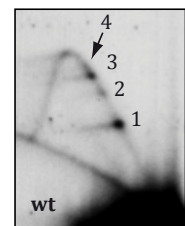
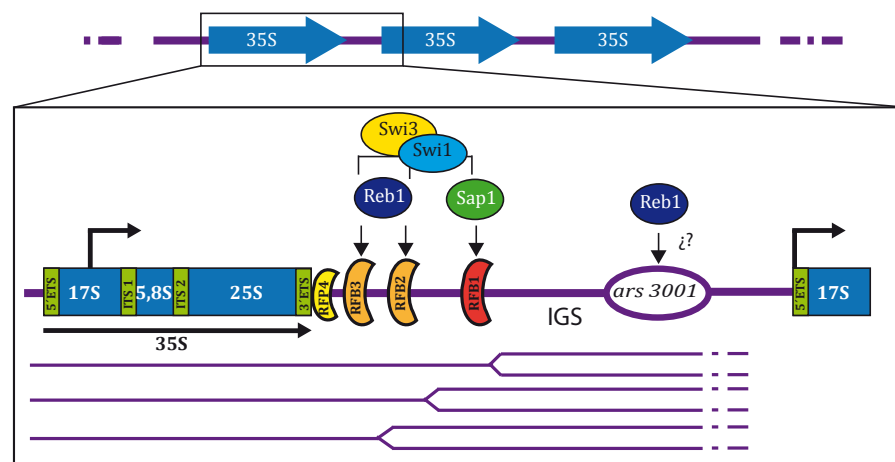


Figura5. Esquema representativo de proteínas de unión al rDNA implicadas en la generación de RFBs naturales en *S. pombe*, *S. cerevisiae* y mamíferos. A. TTF-1 es la proteína de unión a las cajas Sal que actúan

INTRODUCCIÓN

como barreras para las horquillas replicativas en el rDNA de mamíferos de un modo unidireccional (Estraño et al., 1998). En mamíferos la iniciación de la replicación ocurre en el IGS, preferentemente en una región localizada a unas pocas kilobases del sitio de iniciación de la transcripción, aunque en las fases tempranas de la replicación algunos orígenes del rDNA se disparan en la proximidad del TTS (Coffman et al., 2005) **B.** En *S. cerevisiae* la función de las RFB del rDNA requiere de la unión de la proteína Fob1 a dos secuencias específicas, así como la presencia de las proteínas de *checkpoint* replicativo Csm3 y Tof1. **C.** En *S. pombe* existen tres RFBs naturales que requieren de las proteínas Swi1-Swi3, ortólogas de Csm3 y Tof1 de *S. cerevisiae*. La actividad de RFB1 requiere la unión de Sap1, mientras que RFB2 y RFB3 son dependientes de la unión de la proteína Reb1 a sendas secuencias idénticas de 17-bp. Existe un cuarto sitio poco activos en células wt denominado RFP4 (*replication fork pause* 4) donde se observa una ligera pausa de las horquilla. Esta pausa se hace claramente visible cuando RFB1-3 no son activas, como es el caso de células *swi1Δ*. Debido a esta observación, RFP4 se interpreta como consecuencia de la colisión frontal del complejo replicativo con la Pol I (Fig. 5C, geles 2D a la derecha del esquema).

2.4.1. El rDNA de mamíferos

En ratón existen unas diez secuencias idénticas de 18 pb denominadas cajas *Sal* (Grummt et al., 1985; Grummt et al., 1985), organizadas en cuatro grupos, a las que se une la proteína terminadora de la transcripción mTTF1 (*murine transcription termination factor1*) (Bartsch et al., 1988; Gerber et al., 1997) (Fig. 5A). Además de su función como terminadora de la transcripción, nuestro grupo ha demostrado que la proteína TTF1 detiene *in vivo* las horquillas replicativas que se mueven contra transcripción, en cada una de las cajas *Sal* a las que se une, siendo por tanto responsable de diez RFBs presentes en el rDNA de ratón (López-Estraño et al., 1998). En humanos las cajas *Sal* son ligeramente más pequeñas (11 pb) y también se encuentran organizadas en grupos (Grummt et al., 1986). Es notable que la proteína TTF1 humana es capaz de reconocer la las cajas *Sal* de ratón, pero no al revés, probablemente debido a que la secuencia que reconoce la proteína mTTF1 es de una longitud mayor, por lo que el mecanismo se ha conservado pero la secuencia ha divergido ligeramente.

2.4.2. El rDNA de *Saccharomyces cerevisiae*

La estructura del rDNA en la levadura *S. cerevisiae* es ligeramente distinta a la de mamíferos y

INTRODUCCIÓN

a la de *S. pombe*, ya que la secuencia que codifica para el rRNA 5S no se encuentra repetida en otras regiones del genoma, sino que se localiza en la región intergénica de cada repetición del rDNA y es transcrita por la Pol III en sentido contrario al del 35S (Figura 5B). En el IGS1 se localizan las secuencias que actúan como barreras para las horquillas replicativas. En esta levadura las funciones de terminación de la transcripción y del bloqueo de las horquillas replicativas parecen recaer sobre proteínas distintas.

Reb1 es una proteína esencial en *S. cerevisiae* que presenta dos sitios de unión en el rDNA, uno en la región de terminación de la transcripción y otro en la zona promotora, cerca del sitio de iniciación. Reb1 promueve *in vitro* la terminación de la transcripción del rRNA (Ju et al., 1990; Morrow et al., 1993; Morrow et al., 1990). Sin embargo, el papel que juega en la terminación *in vivo* es ambiguo. Por ejemplo, en experimentos de reducción de Reb1, mediante su fusión a *degrón*, hasta una cuarta parte del nivel intracelular normal no se aprecia un aumento de transcritos rRNA con una terminación incorrecta (Kawauchi et al., 2008). Recientemente se ha descrito otra proteína, también con dominios de tipo Myb, denominada Nsi1 (*NTS1 silencing protein 1*), que parece estar involucrada en la terminación de la transcripción por la Pol I (Reiter et al., 2012) y que requeriría, además de la secuencia de unión al DNA, una secuencia rica en Ts adyacente y otra serie de proteínas para llevar a cabo una correcta terminación. Por otro lado, Nsi1 contribuye al silenciamiento de la transcripción por Pol II en el rDNA mediante su unión a proteínas del complejo RENT (*regulator of nucleolar silencing and telophase exit*) de silenciamiento (Ha et al., 2012). Todo esto sugiere que *in vivo* Reb1 se hallaría unida a la secuencia de unión localizada en el promotor, mientras que Nsi1 se uniría al terminador, promoviendo la finalización de la transcripción del rRNA.

Reb1 también se une a la región promotora de varios genes transcritos por la RNA polimerasa II (Angermayr and Bandlow, 1997; Rhee and Pugh, 2011). Esta unión parece modificar la estructura de la cromatina adyacente, lo que facilitaría la interacción de otros factores de

INTRODUCCIÓN

transcripción en estas regiones (Angermayr et al., 2003). La proteína nucleolar Fob1 (*fork blocking less*) se une a dos sitios específicos en el IGS1 y provoca la parada de la horquillas replicativas en ambos sitios (Defossez, 1999; Kobayashi and Horiuchi, 1996). Estas dos RFB fueron las primeras barreras del rDNA que se describieron (Brewer and Fangman, 1988). Para la actividad de estas RFB, además de Fob1, se requieren también el complejo de *checkpoint* de fase S Tof1-Csm3 (Mohanty et al., 2006). Este requerimiento sería debido a que Tof1-Csm3 contrarresta el efecto de la helicasa Rrm3 que promueve el desplazamiento de Fob1 del DNA. Fob1 participa también en el silenciamiento del rDNA y en prevenir la recombinación mediante el reclutamiento de la desacetilasa de histonas Sir2 (Bairwa et al., 2010). Participa en la prevención de la formación de ERCs (círculos extra-cromosómicos de rDNA) (Defossez, 1999) y en la contracción y expansión del número de copias del rDNA. La proteína Fob1 interacciona con Nsi1 tanto en ensayos *in vitro* (Mohanty and Bastia, 2004) como *in vivo* (Ha et al., 2012), pero esta interacción no es necesaria para la actividad de las RFBs, sino que Nsi1 actuaría como un intermediario para la interacción entre Sir2 y Fob1 para el silenciamiento en el rDNA.

2.4.3. El rDNA de *Schizosaccharomyces pombe*

En *S. pombe* existen unas 125 repeticiones en tándem de rDNA localizadas en dos *loci*, uno en cada extremo del cromosoma III. La replicación se inicia en el origen ars3001, localizado en el espaciador intergénico de cada una de las copias de rDNA (Sanchez et al., 1998) (Fig. 5C). En este espaciador existen, además, tres barreras replicativas (RFB1, 2 y 3), que actúan de manera polar, deteniendo solo las horquillas que se mueven contra transcripción. La actividad de RFB2 y RFB3 está mediada por la unión de Reb1 a dos secuencias idénticas de 17 pb (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004), mientras que RFB1 requiere la unión de la proteína Sap1 a una secuencia específica localizada a 3' de las anteriores (Mejía-Ramírez et al., 2005; Krings y Bastia, 2005). De manera similar a *S. cerevisiae*, las tres RFB requieren de la presencia de complejo de *checkpoint* de fase S Swi1-Swi3 (Krings and Bastia, 2004; Mejia-Ramirez et al.,

INTRODUCCIÓN

2005) ortólogo del complejo Tof1-Csm3 de *S. cerevisiae* y de TIMELESS-TIPIN de metazoos. Resulta interesante el hecho de que este complejo también es requerido para la función de la barrera RTS1 y la pausa MPS1 del *locus* del tipo de apareamiento (Dalgaard and Klar, 2000). Swi1-Swi3 forman parte del denominado complejo protector de las horquillas replicativas o FPC (*fork protection complex*) (Noguchi et al., 2004), participando en la estabilización de las horquillas detenidas. Este complejo también participa en el *checkpoint* replicativo, puesto que, junto con Rad3 (Mec1 en *S. cerevisiae*, ATR en metazoos), se requiere para una activación completa de Cds1 (Rad53 en *S. cerevisiae*, CHK2 en metazoos) (Noguchi et al., 2003; Sommariva et al., 2005).

Existe en *S. pombe* un cuarto sitio de pausa de las horquillas en el rDNA denominado RFP4 (*replication fork pause*) que es independiente de Swi1-Swi3 (Krings and Bastia, 2004) y muy poco activo en células wt. RFP4 se hace evidente cuando desaparecen el resto de RFBs. Esto, junto con la observación de que RFP4 no genera pausa introducida en un plásmido de replicación autónoma, ha hecho que se interprete como debido a la colisión de las horquillas replicativas con la Pol I al entrar estas en la zona transcrita.

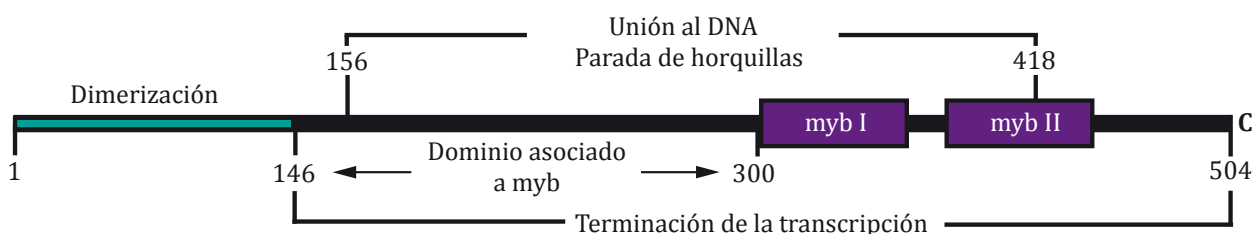


Figura6. Dominios de la proteína Reb1 de *S. pombe* (modificado de Biswas and Bastia, 2008).

Sap1 es una proteína esencial que, además de requerirse para la actividad de RFB1, se encuentra implicada en el cambio de tipo de apareamiento mediante su unión a la secuencia SAS1 del *locus mat*, aunque en esta región no produce parada de las horquillas. En el rDNA Sap1 se une a una secuencia que consiste en dos repeticiones imperfectas invertidas separadas entre sí por unos pocos nucleótidos (Mejía-Ramirez et al., 2005). Esta secuencia

INTRODUCCIÓN

guarda una alta homología con SAS1. La esencialidad de Sap1 no reside en su función en el cambio del tipo de apareamiento ni en promover la actividad de RFB1. Probablemente, es debida a que es necesaria para la integridad genómica y la estabilidad cromosómica (Lahondès et al., 2003).

El gen *reb1+*, que codifica la proteína Reb1 de *S. pombe*, se clonó originalmente mediante PCR con cebadores degenerados para sus ortólogos de *S. cerevisiae* y de *K. lactis* (Zhao et al., 1997). La secuencia codificante de *reb1+* sin regiones UTR es de 1607 pb y contiene dos intrones pequeños de 41 y 51 pb. Recientemente, se ha descrito un intrón de 119 nucleótidos en la región 5'-UTR (Rhind et al., 2011).

Reb1 es una proteína de 504 aminoácidos con un peso molecular de 58,4 kDa, presenta un dominio de dimerización en su extremo amino terminal (Biswas and Bastia, 2008) y dos dominios myb de unión a DNA hacia su extremo carboxílico (Figura 6). Como se ha mencionado anteriormente, existen dos secuencias idénticas de unión de Reb1 de 17 pb cada una cerca del extremo 3' de la unidad transcripcional del rDNA, donde además de detener las horquillas replicativas que se desplazan 3'-5' (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004), Reb1 participa en la terminación de la transcripción del rRNA por la Pol I (Melekhovets et al., 1997) (Zhao et al., 1997).

Antes del inicio de esta tesis, se desconocía si Reb1 se unía in vivo a otros sitios de del genoma de *S. pombe* y cuáles podrían ser sus efectos sobre la replicación del DNA y la transcripción de los genes cercanos.

3.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Caracterización de la regulación de la fase G1 del ciclo celular de *S. pombe* por parte de Reb1.
 - a. Análisis del papel de Reb1 en la respuesta al ayuno de nitrógeno.
 - b. Estudio del papel de Reb1 en la regulación de G1 en ausencia de ayuno de nitrógeno.
2. Estudio del requerimiento de Reb1 para la supervivencia durante la fase estacionaria.
3. Estudio de la regulación tanto post-transcripcional como post-traducciona de Reb1.
4. Estudio de la unión de Reb1 al genoma de *S. pombe*.
5. Determinación de la dependencia de Reb1 en la expresión génica en respuesta al ayuno de nitrógeno.

4.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1.Reb1 participa en la regulación del ciclo celular

4.1.1. Las células *reb1Δ* son deficientes en el apareamiento y en la parada en G1 inducida por ayuno de nitrógeno

Durante el transcurso de una serie de cruzamientos de estirpes de *S. pombe* delecionadas para el gen *reb1*⁺ comprobamos que en estas células se producía una disminución importante de la capacidad de conjugación (Figura 7A). Esta pérdida de fertilidad se debía a que, en ausencia de Reb1, las células son deficientes en la parada en G1 en respuesta a un estrés nutricional como es el ayuno de una fuente de nitrógeno (ver análisis FACS *wt* y *reb1Δ* de la Figura 7B). La parada en G1 es esencial para que se produzca la conjugación y, por tanto, para la diferenciación sexual.

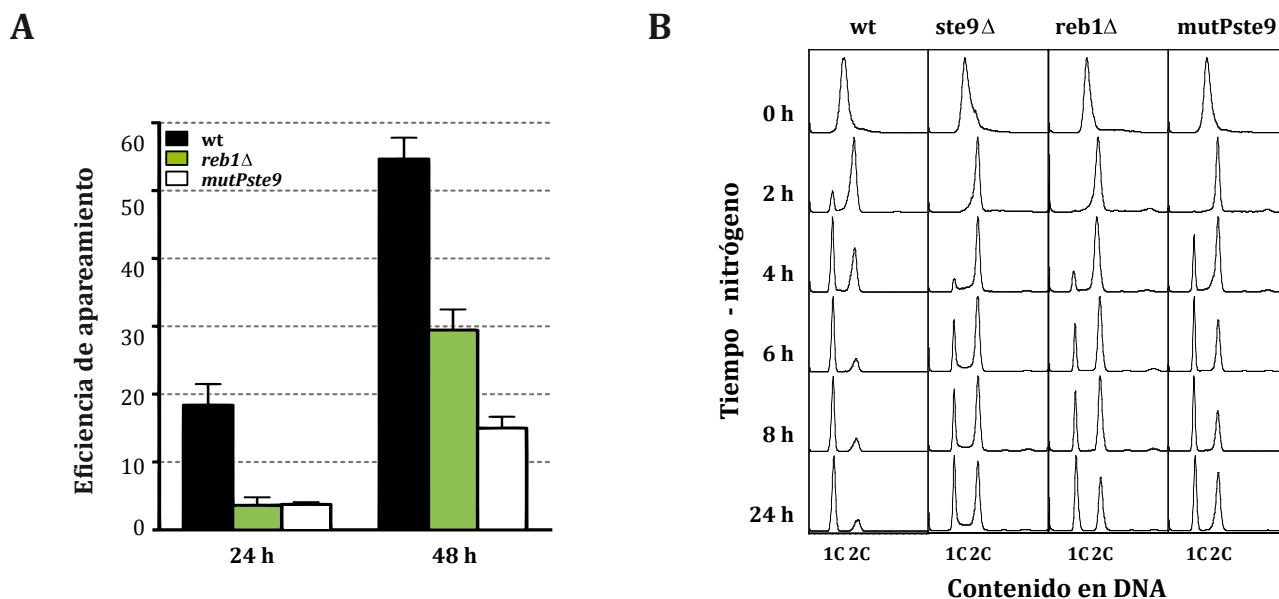


Figura 7. La proteína Reb1 es necesaria para la correcta parada de las células en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno y para el apareamiento de *Schizosaccharomyces pombe*. **A.** Células silvestres (*wt*; 117 h- y 118 h+), *reb1Δ* (D7 h- y D9 h+) y células con el promotor de *ste9* mutado *mutPste9* (LR4Ph- y LR4Ph+) se crecieron independientemente en medio rico, un número equivalente de células h+ y células h- se mezclaron y fueron sembradas en medio MEA para la esporulación. Tras 24 y 48 horas de crecimiento en medio de esporulación a 25°C se calculó la eficacia de apareamiento con la siguiente fórmula: $\text{eficacia} = [2 \times (\text{n}^\circ \text{ de ascas} + \text{n}^\circ \text{ de zigotos})] / [2 \times (\text{n}^\circ \text{ de ascas} + \text{n}^\circ \text{ de zigotos}) + \text{n}^\circ \text{ de células que no están apareando}]$. **B.** Análisis del contenido en DNA mediante citometría de flujo (FACS) durante el transcurso de un ayuno de nitrógeno de células *wt* (972), *ste9Δ* (LR3), *reb1Δ* (D9P) y células con la secuencia de unión de Reb1 al promotor de *ste9* mutada *mutPste9* (LR4P).

RESULTADOS

4.1.2. Reb1 regula la expresión de *ste9+* en condiciones de ayuno de nitrógeno

4.1.2.1. El promotor de *ste9+* contiene una secuencia de unión de Reb1

Puesto que la proteína ortóloga de Reb1 en *S. cerevisiae* actúa como regulador de la expresión de genes transcritos por la RNA polimerasa II (Angermayr et al., 2003), pensamos que la proteína Reb1 de *S. Pombe* podría estar regulando la expresión de algún gen necesario para que se proceda a una conjugación eficaz. Por esta razón, realizamos un búsqueda BLAST de secuencias del genoma de *S. Pombe* que mostrara similitud con la secuencia que reconoce Reb1 en el rDNA (Zhao et al., 1997).

De este modo comprobamos que el promotor del gen *ste9+* contiene una secuencia entre los nucleótidos -198 y -172 con respecto al extremo 5' de la secuencia codificante, que muestra una alta homología con la secuencia de unión de Reb1 a las RFB2 y 3 del rDNA (Figura 8A).

Ste9 es una proteína con repeticiones tipo WD relacionada con Fizzy que en respuesta al ayuno de nitrógeno, promueve la activación de APC, la degradación de la ciclina Cdc13 y, como consecuencia, la parada de las células en G1, lo que es un requisito para la conjugación. Esto nos hizo plantear la hipótesis de que Reb1 podría ser un regulador positivo de la expresión de *ste9+* en respuesta a estrés nutricional, participando de este modo en una conjugación y diferenciación sexual eficaz.

De acuerdo con esta hipótesis comprobamos que de manera similar a las células *ste9Δ* (Kitamura et al., 1998; Yamaguchi et al., 1997), las células mutantes *reb1Δ* son deficientes en la parada en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno (Figura 7B). Además, la mutación de la posible secuencia de unión de Reb1 en el promotor de *ste9+* dando la estirpe *mutPste9*, generó un fenotipo muy similar en cuanto a una baja eficacia de apareamiento y una deficiencia en la parada en G1 bajo ayuno de nitrógeno (Figura 7).

RESULTADOS

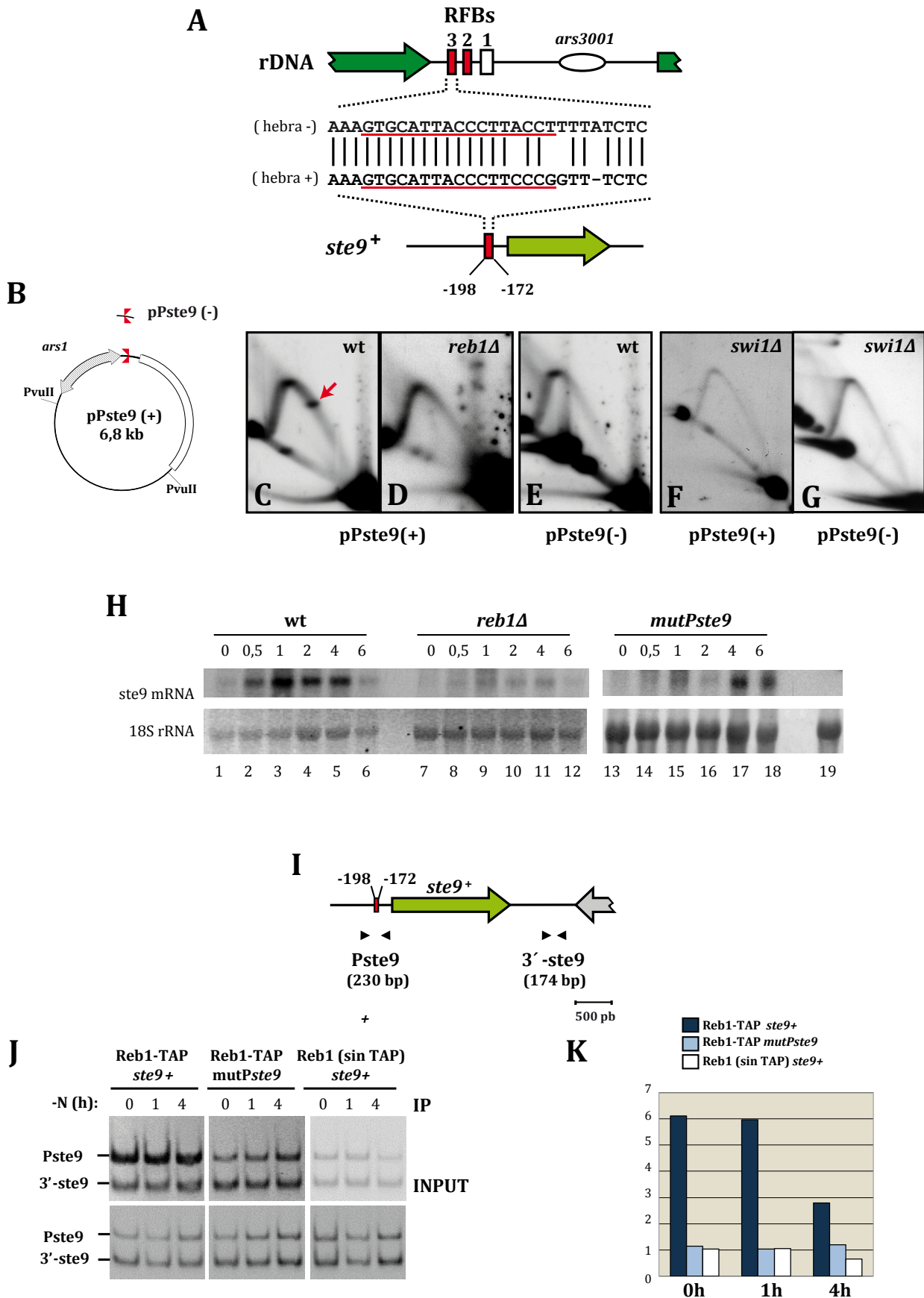


Figura 8. Reb1 se une al promotor de *ste9*⁺ y es requerida para la activación transcripcional de este gen durante el ayuno de nitrógeno. A. Representación esquemática de los sitios de unión de Reb1 en el rDNA y del sitio de unión al promotor de *ste9*⁺. En el rDNA se representan con cajas los sitios donde se sitúan las barreras

RESULTADOS

para las horquillas replicativas (RFB1, RFB2 y RFB3). La RFB1 es dependiente de la proteína Sap1 mientras que RFB2 y RFB3 (rectángulos rojos) son dependientes de la unión de Reb1 a una región de 17 pares de bases (subrayada en rojo) descrita anteriormente (Zhao et al., 1997) necesaria y suficiente para producir las barreras (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004). En el centro se muestra el alineamiento de la secuencia de la RFB3 con la secuencia del promotor de *ste9+* localizada por BLAST. Los números se refieren a pares de bases con respecto al sitio de iniciación de la transcripción. **B.** Esquemática de los plásmidos de replicación autónoma empleados para comprobar la unión de Reb1 al promotor de *ste9+* y la parada polar de la horquilla replicativa al alcanzar el replisoma este complejo. Para ello, un fragmento del promotor de *ste9+* de 250 pb (en rojo) se insertó en una u otra orientación cerca del origen de replicación *ars1* del vector pIRT2, dando lugar a los plásmidos pPste9(+) y pPste9(-). **C-G.** Análisis mediante geles bidimensionales de la replicación del fragmento PvuII grande mostrado en **B.** La unión de Reb1 a la secuencia del promotor de *Ste9* produce bloqueo para las horquillas replicativas (flecha roja en **C**) de manera polar, puesto que no se observa si se introduce en la orientación contraria (**E**). Esta parada de la horquilla es dependiente de Reb1, ya que no se produce en células *reb1Δ* (**D**). De la misma manera que la barreras del rDNA, la parada polar provocada por la inserción de la secuencia del promotor de *ste9+* es dependiente de la proteína Swi1, dado que no se observa en células *reb1+ swi1Δ* (**F**). **H.** Análisis de la expresión del mensajero de *ste9+* mediante *northern blot* de células silvestres (wt; 972 h-), *reb1Δ*, (D9P h-) y *mutPste9* (LR4P h-). Se cultivaron las células a 30°C hasta fase logarítmica en MM, momento en el que se lavaron y se cultivaron en MM-N a 25°C. Se tomaron muestras de células en los tiempos indicados para extracción de RNA y posterior análisis mediante *northern blot*. Se utilizó una sonda de DNA específica de *ste9+* marcada radiactivamente para analizar los mensajeros que codifican para el gen *ste9+*. Como control negativo se utilizó el RNA de una estirpe en la que se sustituyó el gen *ste9+* por *ura4+* (carril 19). **I.** Diagrama que muestra los cebadores usados para la amplificación por PCR de DNA de muestras procedentes de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), indicándose el tamaño del producto. **J.** PCRs de la cromatina inmunoprecipitada. Se crecieron células ZG023 (*reb1-2xTAP:KanMX6 ste9+*), ZGLR002 (*reb1-2xTAP:KanMX6 mutPste9*) y 972 (wt) en MM hasta fase exponencial, se lavaron y se cultivaron de nuevo en MM-N a 25°C durante los tiempos indicados, se tomaron muestras de células y se fijaron con formaldehído, posteriormente se extrajo la cromatina, se fragmentó por sonicación y se tomó una muestra como control (INPUT). El resto de la cromatina se inmunoprecipitó (IP) con resina de IgG-sefarosa. Los DNAs de las IP del INPUT se amplificaron mediante PCR usando los oligos descritos en **I** para determinar de manera simultánea la unión de Reb1 al promotor de *ste9+* y a una región aguas abajo de este gen. **K.** Cuantificación del enriquecimiento relativo de la secuencia del promotor de *ste9+*, calculada mediante la siguiente fórmula: enriquecimiento en secuencia del promotor en IP = [intensidad producto oligos del promotor IP/intensidad producto de los oligos a 3' IP]/[intensidad producto oligos del promotor INPUT/intensidad producto de los oligos 3' INPUT].

4.1.2.2. *Reb1 se une in vivo al promotor de ste9+*

Como se ha mencionado en la Introducción, la unión de Reb1 a las secuencias de las RFB2 y RFB3 del rDNA genera barreras para las horquillas replicativas que avanzan en sentido contrario a la transcripción de los genes ribosómicos, tanto en su contexto cromosómico como

RESULTADOS

cuando se insertan en un plásmido (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004). Por lo tanto, si Reb1 se une realmente a la secuencia del promotor de *ste9+*, esta podría generar también la parada de las horquillas replicativas de un modo dependiente de Reb1. Para comprobarlo, clonamos en ambas orientaciones un fragmento de 230 pb promotor de *ste9+*, que contenía el posible sitio de unión, cerca del origen de replicación *ars1* del plásmido de replicación autónoma pIRT2. En estos plásmidos, de las dos horquillas generadas en *ars1*, la que se mueve en el sentido de la agujas del reloj (horquilla CW) es la primera que llega al inserto y la que lo replica. De acuerdo con lo que conocemos de las barreras RFB2 y 3 del rDNA, de los dos plásmidos generados, pPste9(+) contiene el inserto en la orientación activa para la parada de la horquilla CW, si Reb1 se unía a él; mientras que en pPste9(-) la orientación es tal que, aunque Reb1 se uniera al inserto, el complejo no sería activo sobre el desplazamiento de la horquilla CW. De acuerdo con la hipótesis planteada, el análisis de la replicación del fragmento *PvuII* mediante electroforesis 2D, demostró que el inserto en pPset9(+) provoca la parada de la horquilla, dando lugar a la acumulación de un intermediario de replicación en Y (Figura 8C, flecha), mientras que en pPste9(-) se mostró inactivo (Figura 8E). Además, esta parada de la horquilla en pPste9(+) ocurría de un modo dependiente de Reb1, puesto que en células *reb1Δ* no se produjo la parada de la horquillas en pPste9(+) (Figura 8D).

La proteína Swi1 (ortóloga de Tof1 de *S. cerevisiae*) es necesaria para la actividad de las barreras del rDNA (Krings and Bastia, 2004). Como se observa en la Figura 8 (F y G), la parada de la horquilla en el promotor de *ste9+* muestra esta misma característica, puesto que no se observa acumulación del intermediario en Y en células *swi1Δ*.

En el apartado de resultados del ChIP-seq, mostrado más adelante, constatamos la unión *in vivo* de la proteína Reb1 al promotor de este gen en su contexto genómico (pico número 25 de la Tabla 3).

RESULTADOS

Debido a que la proteína Reb1 se requiere para una correcta parada en G1 inducida por ayuno de nitrógeno y a la presencia de un sitio de unión de Reb1 en el promotor de *ste9+*, pensamos que Reb1 podría estar regulando la expresión de *ste9+* en condiciones en las que la disponibilidad de nitrógeno está limitada. Para comprobar esto se procedió al cultivo de células silvestres, *reb1Δ* y *mutPste9* hasta fase exponencial en medio mínimo, y se realizó un ayuno de nitrógeno durante los tiempos indicados en la figura 8 H. Se extrajo el RNA de las células y se realizó un northernblot, para la visualización del mensajero de *ste9+* se utilizó una sonda específica con su secuencia. Las células silvestres creciendo en medio con nitrógeno muestran una expresión reducida del mensajero de *ste9+*, que aumenta rápidamente tras la eliminación del nitrógeno del medio, alcanzando el nivel máximo de expresión una hora después de la eliminación de este nutriente, tras 6 horas de ayuno los niveles de expresión de *ste9+* se reducen a los niveles de expresión de las células creciendo en medio mínimo. La oleada de sobreexpresión del mensajero de *ste9+* no se observa en las células que carecen de Reb1, hecho que concuerda con la deficiencia en la parada en G1 de estas células. Estos resultados indican que Reb1 es necesaria para la sobreexpresión de *ste9+* que lleva a la parada en G1, requisito esencial para la conjugación y la diferenciación sexual. El rápido incremento de expresión del mensajero de *ste9* no tiene lugar en las células en las que se ha mutado la secuencia de unión de Reb1 en el promotor de *ste9*, solo transcurridas cuatro horas de ayuno se comienza a apreciar un aumento de los niveles de *ste9*.

4.1.2.3. Reb1 se encuentra unido al promotor de ste9+ en células en crecimiento exponencial y permanece unido tras la retirada del nitrógeno del medio

Ya que Reb1 se requería para la sobreexpresión de *ste9+* bajo ayuno de nitrógeno, comprobamos la unión de Reb1 al promotor de *ste9+* (*Pste9+*) antes y durante el ayuno. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguidos de PCR constatamos que, en una estirpe en la que Reb1 ha sido fusionada con el epítipo TAP para la purificación en tándem, Reb1 se encuentra unida al promotor de *Pste9+* incluso previamente al ayuno

RESULTADOS

durante el crecimiento en fase exponencial en MM completo y que permaneció unida tras retirar la fuente de nitrógeno (Figura 8 I-K). Por tanto, esta unión constitutiva Reb1-*Pste9+* es necesaria pero no suficiente para la sobreexpresión de *ste9+* inducida por el ayuno de nitrógeno.

4.1.3. La expresión periódica de *ste9+* no está regulada por Reb1

En concordancia con la función que lleva a cabo en la regulación de la fase G1 del ciclo celular, el gen *ste9+* presenta un pico de expresión durante esta fase (Peng et al., 2005; Rustici et al., 2004; Tournier and Millar, 2000). Dado que Reb1 se encuentra constitutivamente unida a *Pste9+* quisimos comprobar si además de requerirse para su sobreexpresión en ayuno de nitrógeno, también participaba en la regulación de la expresión periódica de *ste9+* en un ciclo celular normal. Para ello, se utilizó un bloqueo *cdc25-22* a temperatura restrictiva durante 4 horas para sincronizar células *cdc25-22 reb1+* y *cdc25-22 reb1Δ* en G2 tardío, seguido del análisis cuantitativo del mRNA de *ste9+* mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR) a distintos tiempos desde la liberación del bloqueo a temperatura permisiva. También se cuantificó el porcentaje de células binucleadas (mitosis) y el índice de septación (células en G1+S) mediante tinción simultánea con DAPI y calcofluor, para seguir la salida de las células del bloqueo y su entrada en mitosis y G1 (Figura 9). A juzgar por el momento de aparición de las células binucleadas, en ausencia de *reb1+* se produce un retraso de unos 50 min hasta que se completa la mitosis (Figura 9, panel inferior) comparado con las células wt (Figura 9, panel superior). Sin embargo, de manera similar a las células wt, *ste9+* se sobreexpresó en las células *reb1Δ* durante su entrada en G1 para disminuir posteriormente, justo antes de la ola de septación. Estos resultados indican que Reb1 no se requiere para la expresión periódica de *ste9+* durante un ciclo celular normal.

Resultados no mostrados (Rodríguez-Sánchez et al., 2011) indican además que cuando se sobreexpresa Reb1 se produce también una ligera sobreexpresión de *ste9+*.

RESULTADOS

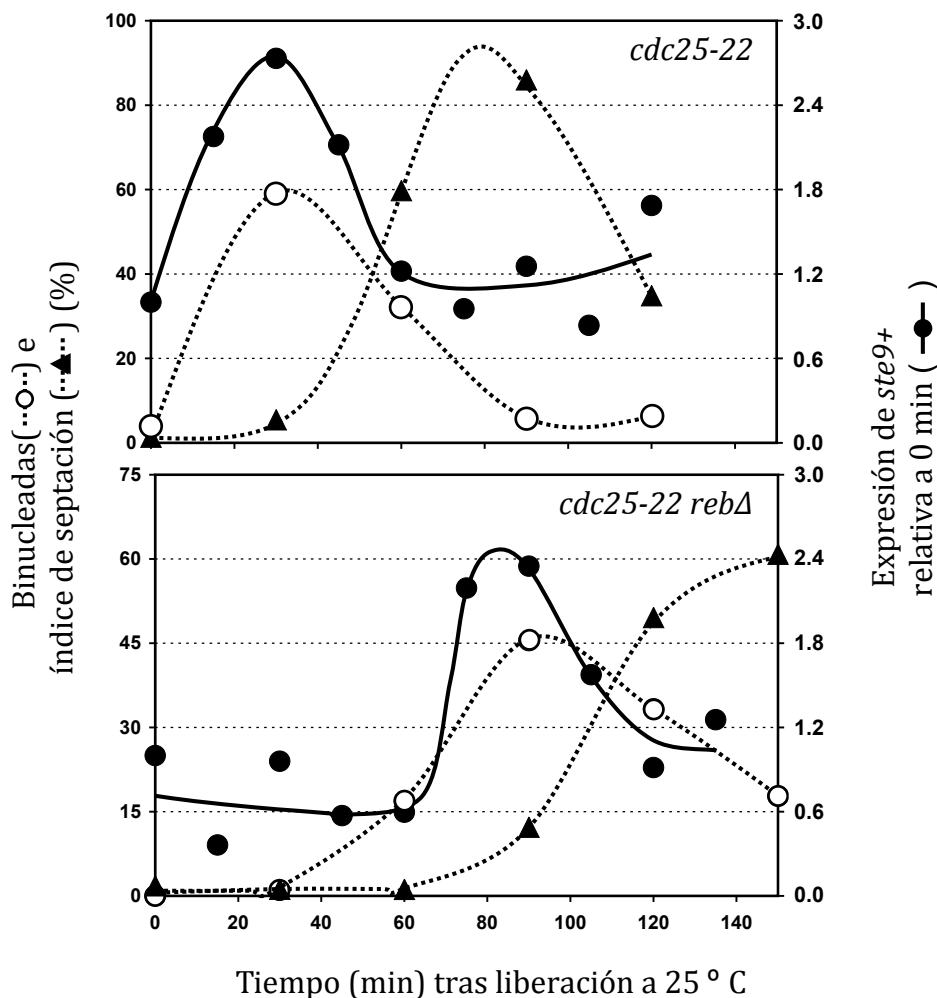


Figura 9. La ausencia de Reb1 no impide la expresión periódica de *ste9+*. Cultivos termosensibles crecidos a 25°C hasta fase exponencial de células *cdc25-22* y MR006 (*cdc25-22 reb1Δ*) creciendo en YES, se sincronizaron en G2 tardío mediante incubación a 36°C durante 4 horas. Tras este periodo se bajó la temperatura a 25°C y se tomaron muestras en los tiempos indicados. El mRNA extraído se convirtió en cDNA mediante retrotranscripción, y este producto se usó para la realización de PCR cuantitativas a tiempo real para monitorizar la expresión de *ste9+* relativa a la expresión de *cdc2+*, usado como control de un gen cuya expresión es constante a lo largo del ciclo. Para comprobar la sincronización y la salida de las células del bloqueo *cdc22-25*, también se cuantificó el porcentaje de células binucleadas (mitosis) y el índice de septación (células en G1+S) mediante tinción simultánea con DAPI y calcofluor.

4.1.4. Reb1 actúa como regulador de la fase G1 en ausencia de estrés nutricional: interacciones genéticas

Tras comprobar que Reb1 regula la fase G1 de células bajo estrés nutricional, pensamos que sería interesante estudiar si también participa en la regulación de esta fase bajo otras

RESULTADOS

condiciones, para ello estudiamos la interacción genética de Reb1 con proteínas que de manera directa o indirecta influyen en la transición G1/S.

4.1.4.1. Las mutaciones de *reb1+* y *wee1+* producen letalidad sintética

La proteína quinasa Wee1 regula de manera negativa la transición G2-mitosis, previniendo una entrada prematura en mitosis por medio de una fosforilación inhibitoria de Cdc2 (Russell and Nurse, 1987).

En ausencia de Wee1, las células entran en mitosis con un tamaño inferior al normal (aproximadamente la mitad) (Russell and Nurse, 1987). Sin embargo, estas células son viables gracias a que responden alargando de forma importante la duración de G1 hasta alcanzar un tamaño mínimo suficiente para iniciar la fase S. Nuestra hipótesis era que, en estas condiciones, si Reb1 regula la duración de la fase G1 impidiendo la entrada en S de forma prematura, la ausencia de Reb1 junto con una deficiencia de Wee1, debería mostrar letalidad sintética al impedirse la compensación de tamaño durante G1, de manera similar a lo que ocurre entre Ste9 y Wee1 (Kitamura et al., 1998; Yamaguchi et al., 1997).

Con objeto de comprobar esta hipótesis se generó una estirpe mutante doble *reb1Δ wee1-50* por cruzamientos de las estirpes con las mutaciones sencillas. Las células portadoras de la mutación termosensible *wee1-50* son pequeñas pero viables a la temperatura restrictiva de 37°C.

Como se observa en el ensayo de crecimiento de diluciones seriadas de la Figura 10A, todas las estirpes con las mutaciones sencillas crecieron a la temperatura restrictiva, mientras que las células mutantes dobles *reb1Δ wee1-50* mostraron letalidad sintética. Mediante citometría de flujo analizamos el contenido de DNA de células sometidas a un cambio de 25°C a 32°C ó 35°C. La aparición progresiva de células con un contenido 1C en el mutante sencillo *wee1-50* (figura 10B, cabeza de flecha) indica que un número suficiente de células ha conseguido alargar su fase G1 y ha desarrollado citocinesis previa a la entrada en replicación. En los dobles mutantes no solo no se observa este pico en G1, sino que además, según progresa el

RESULTADOS

crecimiento a 32 ó 35°C, se aprecia un incremento del número de células con un contenido incluso superior a 2C. Esto indica que los mutantes *wee1-50*, en ausencia de Reb1, entran de manera prematura en replicación al no alargar G1 lo suficiente como para alcanzar un tamaño adecuado. El desarrollo reiterado de ciclos con una entrada prematura en G2 (deficiencia en Wee1) seguida de una entrada prematura en S (deficiencia en Reb1) en los mutantes dobles *reb1Δ wee1-50* resulta en células inviables.

Las células mutantes dobles crecidas a 35°C mostraron hasta cuatro núcleos y múltiples septos, indicando que entran en mitosis antes de que se haya completado la citocinesis (Figura 10C). Es probable que la finalización de la citocinesis esté comprometida en estas células debido a su pequeño tamaño y su forma redondeada sin polaridad, generándose células con un contenido de DNA superior 2C, como se observa en los perfiles de citometría de flujo (Figura 10B).

La observación al microscopio de las células *reb1Δ wee1-50* creciendo en placa a temperatura restrictiva mostró que éstas forman microcolonias compuestas por unas ocho células de muy pequeño tamaño, indicando que después de tan sólo tres divisiones, las células cesan su proliferación.

RESULTADOS

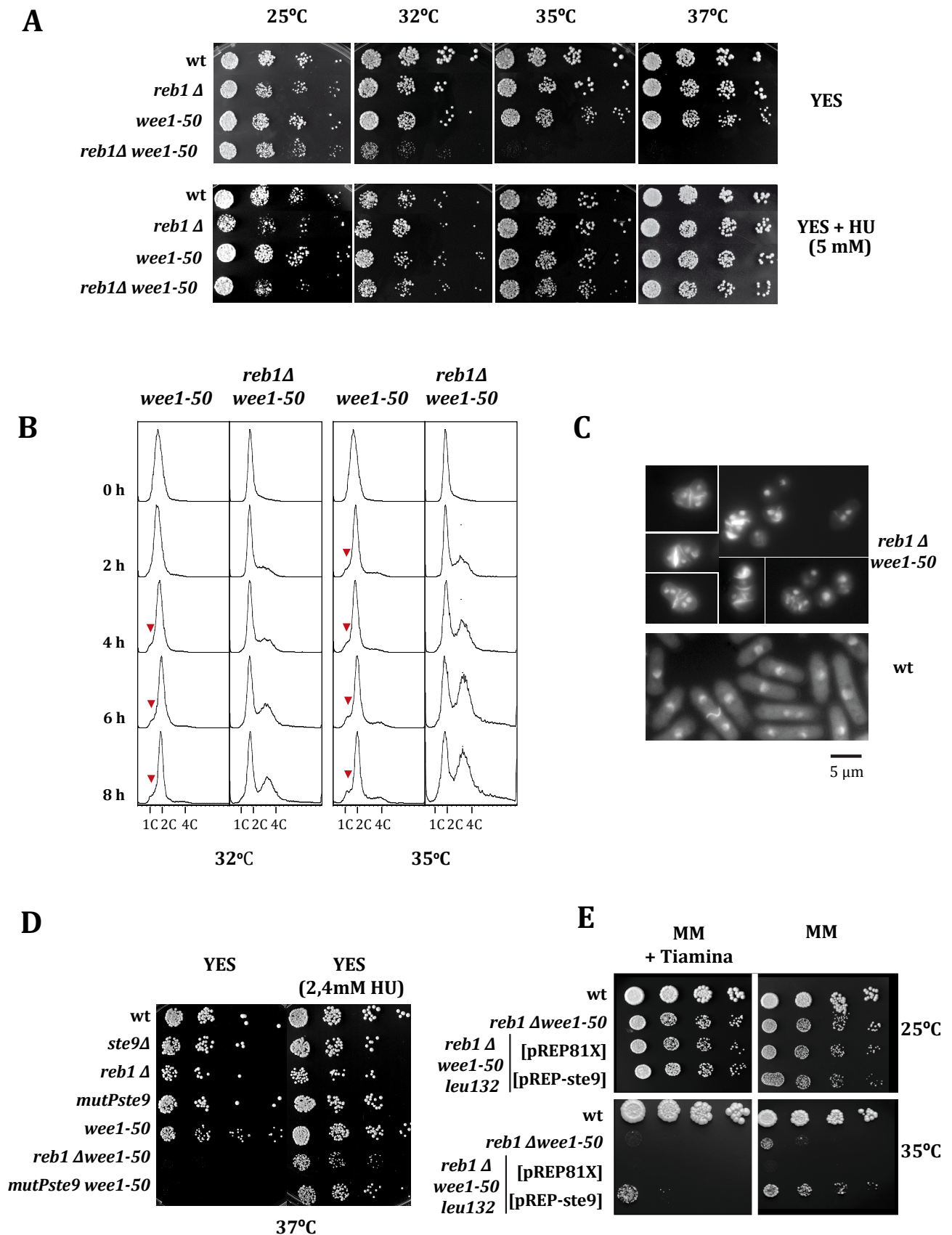


Figura 10. La delección de *reb1* produce letalidad sintética con la mutación *wee1-50* y deficiencias en el alargamiento de la fase G1. **A.** Ensayo de crecimiento mediante diluciones seriadas a partir de cultivos en fase exponencial crecidos en YES a 25°C. Se sembraron diluciones de células wt (972), *reb1 Δ* (D9P), *wee1-50* (MR011) y *reb1 Δ wee1-50* (MR014) en placas de YES o YES + HU (hidroxiurea) y se incubaron a las temperaturas

RESULTADOS

indicadas. **B.** Análisis del contenido en DNA de las células usadas en **A** crecidas hasta fase logarítmica en YES a 25°C y transferidas a 32°C o 35°C el tiempo indicado. La cabeza de flecha roja indica la población de células con contenido 1C. **C.** Tinción simultánea con DAPI y Calcofluor para observar el fenotipo de células MR014 (*reb1Δ wee1-50 h-*) tras 6 horas de cultivo a 35°C. El cuadro inferior muestra células wt crecidas en las mismas condiciones. **D.** Ensayo de la reversión de la letalidad sintética por HU. Las células wt (972), *ste9Δ* (LR3), *reb1Δ* (D9P), *mutPste9* (LR4P), *wee1-50* (MR011), *reb1Δ wee1-50* (MR014) y *mutPste9 wee1-50* (MR016) se crecieron hasta fase exponencial en cultivos líquidos de YES a 25°C y se hicieron diluciones seriadas de los cultivos que se sembraron en placas de YES y YES +HU. Las placas se incubaron a la temperatura restrictiva de 37°C durante 3 días. **E.** Ensayo de la reversión de la letalidad sintética del mutante *reb1Δ wee1-50* (MR014) por sobreexpresión *ste9+*. Se crecieron las estirpes wt (972), *reb1Δ wee1-50* (MR014) y *reb1Δ wee1-50 leu1-32* (MR023) transformada con pREP81X o con pREP81X-*ste9* en MM a 25°C hasta fase logarítmica en presencia o ausencia del represor tiamina. Se realizaron diluciones seriadas de las células que fueron sembradas en placas de MM en presencia o ausencia de tiamina e incubadas a 25°C o 37°C. La tiamina reprime la expresión de *ste9+* clonado bajo el promotor de *nmt1* en pREP81X.

4.1.4.2. La hidroxiurea revierte la letalidad sintética de las mutaciones *reb1Δ* y *wee1-50*

De acuerdo con la idea de que la letalidad sintética de las mutaciones *reb1Δ* y *wee1-50* se debe a una entrada prematura de las células en replicación, la adición de una baja concentración de hidroxiurea (HU) al medio (inhibidor de la ribonucleótido reductasa) revirtió parcialmente esta letalidad. El retraso en la entrada en la fase S y el alargamiento de la duración de esta fase mediado por la HU, permite el crecimiento de la célula antes de la división mitótica hasta un tamaño compatible con la proliferación (Figura 10A y B). Este mismo efecto ha sido observado previamente para la letalidad sintética de *ste9Δ* y *wee1-50* (Yamaguchi et al., 1997).

4.1.4.3. La sobreexpresión de *ste9+* revierte parcialmente la letalidad sintética de las mutaciones *reb1Δ* y *wee1-50*

Puesto que Reb1 regula la sobreexpresión de *ste9+* en condiciones de ayuno de nitrógeno promoviendo la parada en G1, quisimos estudiar si la letalidad de las células *wee1-50* provocada por la delección *reb1+* podría deberse también a una deficiente regulación de *ste9+*. Los resultados mostrados en la Figura 10D y E son consistentes con esta hipótesis. La sobreexpresión ectópica de *ste9+* en el vector de expresión pREP18X, mediante la eliminación

RESULTADOS

del represor de Pnmt1 tiamina, revirtió parcialmente la letalidad de la delección de *reb1+* en células *wee1-50* a temperatura restrictiva (Figura 10E). Además, en la Figura 10D se puede observar que la mutación del sitio de unión de Reb1 en el promotor de *ste9* (*mutPset9*) junto con la mutación *wee1-50* produce letalidad sintética a temperatura restrictiva, de manera similar a la doble mutación *reb1Δ wee1-50*, y que la adición de HU al medio la revierte parcialmente. Es decir, la delección de *reb1Δ* y la supresión de la unión de Reb1 al promotor de *ste9+* generan un fenotipo similar en células *wee1-50*.

4.1.4.4. En ausencia de Reb1, la deficiencia del componente del complejo MBF, Cdc10, causa una deficiente parada en G1 y letalidad a temperatura semipermisiva

Como se mencionó en la introducción, la proteína Cdc10 forma parte del complejo multiproteico MBF, también conocido como DSC1 (DNA synthesis control complex). Este complejo, formado por las proteínas Cdc10, Res1, Res2, Rep1 y Rep2, es un regulador de la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en el paso G1/S (Bahler, 2005; Dutta et al., 2008). Las células portadoras de la mutación *cdc10-129* sintetizan una proteína Cdc10 que no es funcional a la temperatura restrictiva de 37°C, de modo que la mayoría de las células del cultivo se detienen en G1 tras 4 horas a esta temperatura. A 25°C las células *cdc10-129* crecen normalmente, mientras que las temperaturas de 30°C y 32°C son semipermisivas. Puesto que los mutantes *reb1Δ* son deficientes en la parada en G1, quisimos estudiar el comportamiento del mutante doble *cdc10-129 reb1Δ*, comparándolo con estirpes isogénicas portadoras de las mutaciones sencillas *reb1Δ* o *cdc10-129* a las distintas temperaturas.

Como puede observarse en la Figura 11A, la mutación doble *reb1Δ cdc10-129* resultó inviable a la temperatura semipermisiva de 32°C, mientras que las células con mutaciones sencillas *reb1Δ* o *cdc10-129* fueron capaces de crecer.

Esta letalidad sintética de *reb1Δ* y *cdc10-129* a temperaturas semipermisivas es consistente con los resultados que ya hemos descrito anteriormente para *wee1*, e indican que en ausencia

RESULTADOS

de Reb1, las células afectadas en su paso por el punto “start”, probablemente por una baja expresión de los genes necesarios para la replicación del DNA a temperatura semipermisiva, continúan el ciclo con la consiguiente pérdida de viabilidad. Como era de esperar, a temperatura restrictiva no se observó crecimiento de las células *cdc10-129* ni de aquéllas con la doble mutación. Resultados no mostrados indican que la adición de HU al medio no revierte el fenotipo de letalidad sintética del mutante doble *reb1Δ cdc10-129* a temperaturas restrictivas, esto se debe a que la hidroxíurea produce una parada en la fase de replicación por la disminución del reservorio de nucleótidos disponibles para la síntesis del DNA, pero no favorece la expresión de los genes dependientes de MBF.

El análisis mediante FACS del contenido de DNA muestra a 30°C una pequeña población de células *cdc10-129* con un contenido de DNA 1C, correspondiente a G1, que aumenta progresivamente en el tiempo (Figura 11B, panel superior). Esto indica que a esta temperatura, la fase G1 se alargó lo suficiente como para que algunas células experimenten citocinesis antes de iniciar la fase S. Esta población 1C no aparece en el cultivo de las células *cdc10-129 reb1Δ*.

Este efecto es mucho más evidente a mayores temperaturas (Figura 11B, paneles inferiores). Después de 4 horas a 32°C, aparece un alto porcentaje de células *cdc10-129* con un contenido de DNA 1C, mientras que en el mutante doble esta población es minoritaria. Esto indica que Reb1 es requerida para una parada eficaz de las células en G1 cuando la actividad de Cdc10 disminuye, como ha sido observado previamente en el doble mutante *ste9Δ cdc10-129* (Kitamura et al., 1998). Esta parada de algunas células en G1 es dependiente de Reb1. Es conocido que el alelo *cdc10-129* muestra “escape”, de modo que las células *cdc10-129* escapan del bloqueo en G1 si se mantienen suficiente tiempo a la temperatura restrictiva. Como consecuencia, el pico 1C observado en las células *cdc10-129* al cabo de 4 horas a 32°C, disminuye a las 6 y 8 horas a mismo tiempo que el pico 2C aumenta. Esto no se observó en el mutante doble, dado que en esta estirpe no se produce una acumulación importante de

RESULTADOS

células con un contenido 1C de DNA. Nuestra interpretación es que el escape de las células *cdc10-129* desde la parada en G1 propio de este alelo, se intensifica de forma importante en ausencia de Reb1, lo cual es deletéreo debido, probablemente, a que desarrollan una replicación abortiva. Alternativamente, las células podrían iniciar una mitosis catastrófica desde G1 en ausencia de Reb1. Sin embargo, creemos que esto es poco probable puesto que no hemos observado un número significativo de células *cdc10-129 reb1Δ* con fenotipo *cut* (*cell untimely torn*) (Hirano et al., 1986) a ninguna temperatura, es decir, células en las que la citocinesis ha sucedido antes de finalizar la cariocinesis, con lo cuál presentan el núcleo dividido por el septo.

El perfil del contenido de DNA de las estirpes *cdc10-129* y *cdc10-129 reb1Δ* a 37°C fue también distinto (Figura 11B, panel.inferior). Dos horas después del cambio de temperatura sólo una pequeña fracción de las células mutantes dobles se detiene en G1 comparado con las *cdc10-129*. A las 4 horas, tiempo utilizado rutinariamente en experimentos de sincronización, la mayoría de las células *cdc10-129* están en G1, mientras que el perfil observado en las *cdc10-129 reb1Δ* consistió en un pico más amplio de células con un contenido heterogéneo de DNA o en dos picos muy próximos entre sí. Como se vio a 32°C, también se produjo un escape del bloqueo en G1 cuando las células *cdc10-129* se mantuvieron durante más tiempo a 37°C. Las células mutantes doble, sin embargo, mostraron una distribución muy heterogénea del contenido de DNA tras 8 horas a la temperatura restrictiva.

RESULTADOS

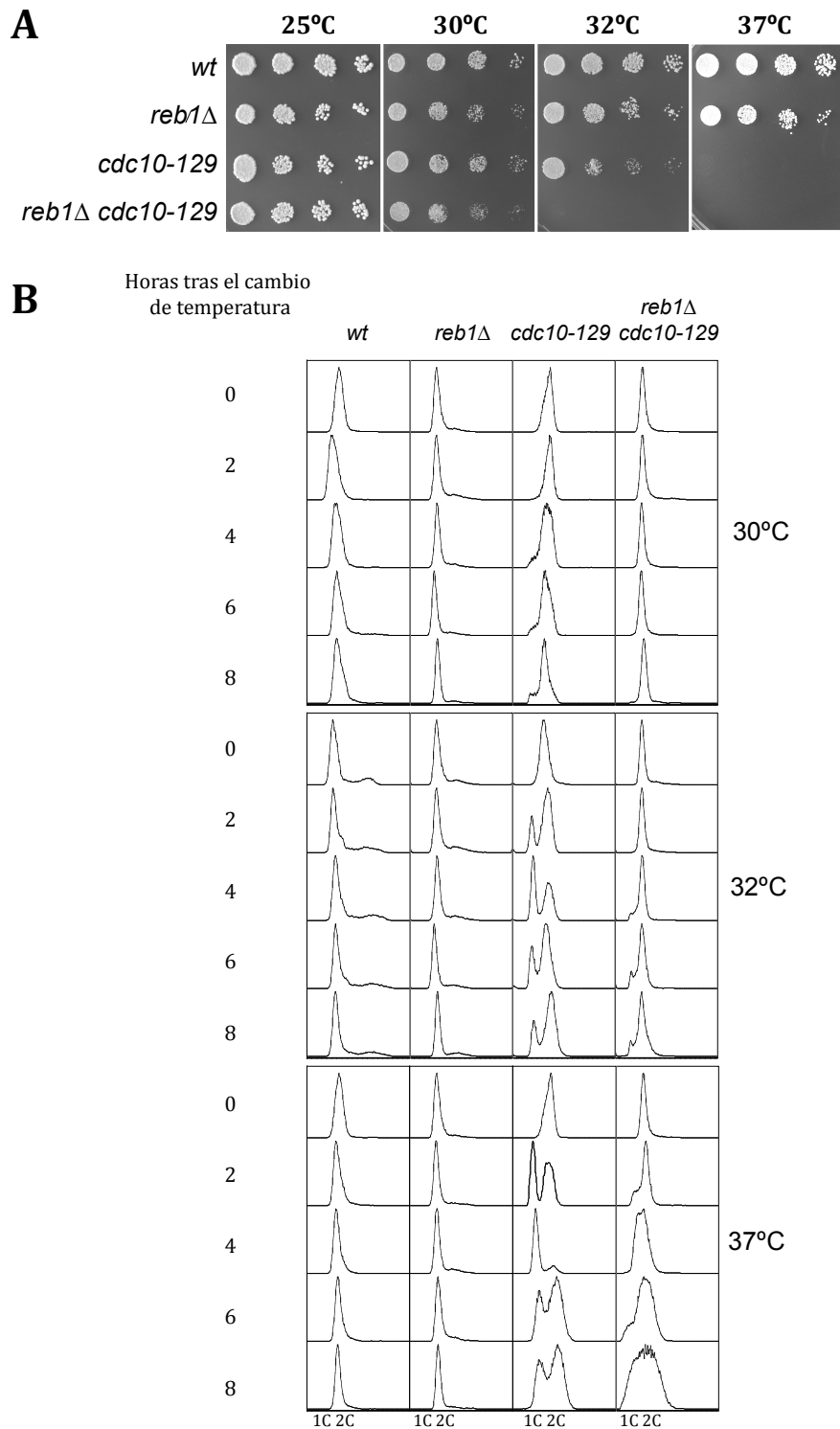


Figura 11. La mutación doble *reb1Δ cdc10* produce letalidad sintética incluso a temperatura semipermisiva, además de una parada deficiente en G1. A. Ensayo de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial en YES a 25°C de células *wt* (972), *reb1Δ* (D9P), *cdc10-129* (MR030) y *reb1Δ cdc10-129* (MR018) en

RESULTADOS

placas de YES incubadas a las temperaturas indicadas. **B.** Estudio del contenido en DNA mediante citometría de flujo de las estirpes de **A** crecidas hasta fase exponencial a 25°C y transferidos a las temperaturas indicadas.

4.1.5. *Reb1* es necesaria para la reentrada de las células en proliferación desde G0

4.1.5.1. *Reb1* es requerida para la viabilidad celular en quiescencia (CLS)

Un cultivo alcanza la fase estacionaria o de saturación cuando, una vez se adquiere una alta concentración celular y los nutrientes se van agotando, las células cesan su proliferación. En este estado, en ausencia de células de tipo de apareamiento contrario, las células de *S. pombe* no pueden conjugarse y entran en un estado de quiescencia de tipo G0 (Su et al., 1996). Esta fase de quiescencia está caracterizada por una serie de cambios morfológicos y de expresión génica que permiten a las células adquirir ciertos niveles de resistencia frente a condiciones adversas. Cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables, las células salen del periodo G0 y reentran en proliferación vegetativa normal (Figura 1). El tiempo en que las células en fase estacionaria permanecen viables se denomina esperanza de vida cronológica (CLS, *chronological life span*), frente a la esperanza de vida replicativa (RLS, *replicative life span*), que es una medida del número de eventos mitóticos que una célula desarrolla antes de entrar en un estado no replicativo o senescencia.

En el transcurso de experimentos realizados con estirpes *reb1Δ*, observamos que cuando se inoculaba medio fresco con células procedentes de preinóculos saturados en medio mínimo, éstas mostraban dificultades para reentrar en proliferación y alcanzar crecimiento exponencial, lo que sugería que la viabilidad celular en G0, es decir la CLS, en MM estaba afectada en ausencia de *Reb1*. Para analizar este fenotipo con más detalle estudiamos cultivos de las estirpes wt (972) y *reb1Δ* (D9P) mantenidos en G0 durante varios días tanto en YES como en MM. Se denomina T0 al día en que las células han alcanzado la saturación, T1 al día siguiente y así sucesivamente. Como control estudiamos también cultivos de estas estirpes en fase exponencial en ambos medios. Se analizó la capacidad de volver a proliferar de estas

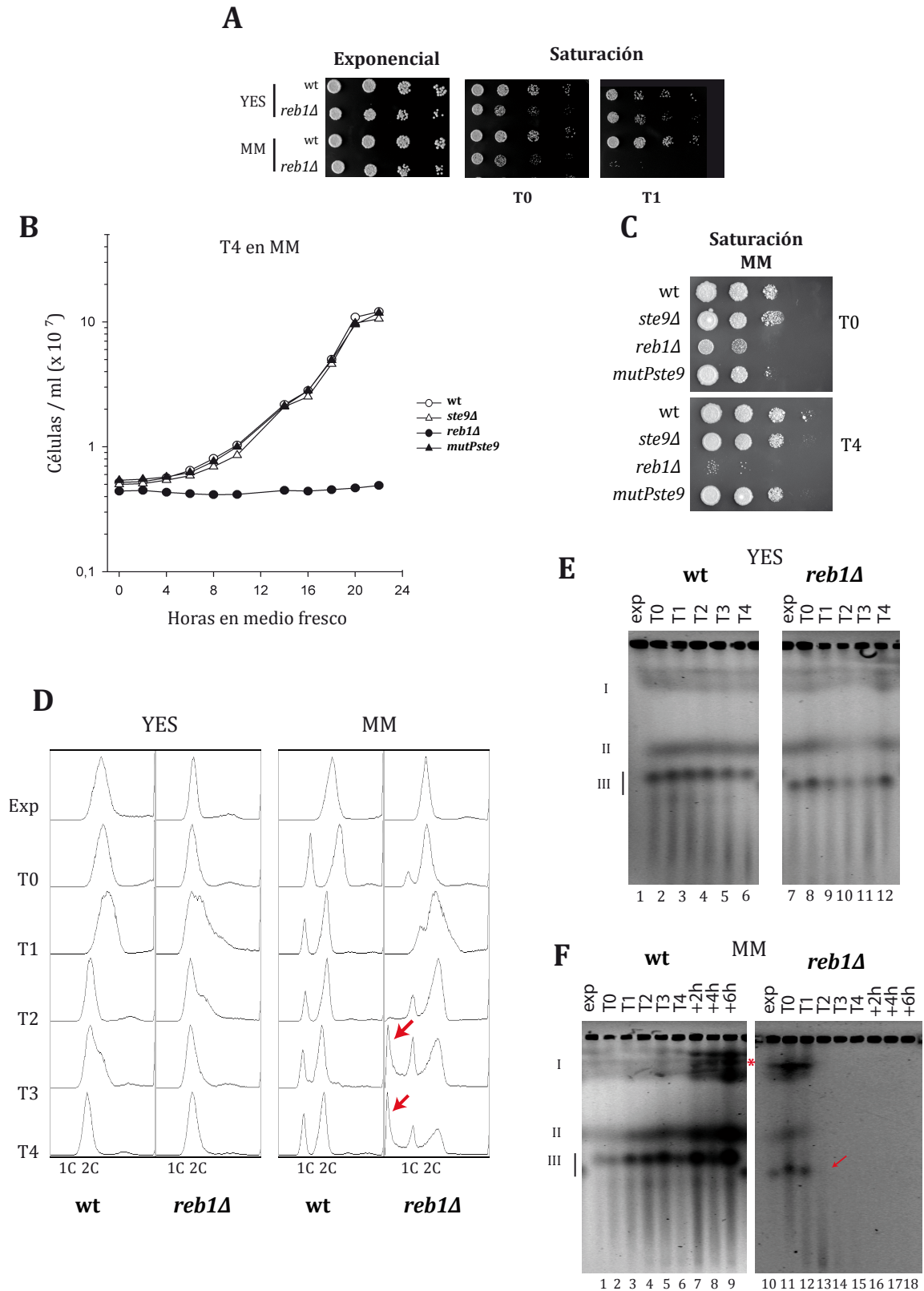
RESULTADOS

células mediante ensayos de diluciones seriadas Como se muestra en la Figura 12A, a medida que el tiempo en G0 se incrementó, las células *reb1Δ* mostraron un crecimiento progresivamente menor, de modo que a los 2 días de permanencia en G0 en MM, el crecimiento de las células *reb1Δ* fue difícilmente detectable. Esto indica que Reb1 es necesario para la supervivencia de las células en estado de quiescencia G0 en MM. Este fenotipo de las células *reb1Δ* resultó ser independiente del papel de Reb1 en la regulación de la expresión de *ste9+*, puesto ni las células *ste9Δ* ni las *mutPste9* pierden viabilidad durante su permanencia en G0 comparadas con las células wt (Figura 12C). En la Figura 12B se muestran los resultados obtenidos en un análisis similar, en el que se estudió la reentrada en proliferación en medio líquido tras cuatro días en G0, cuando las células se transfieren a medio fresco a una concentración inicial de $\sim 5 \times 10^6$ células/ml. Como se puede observar las células wt, *ste9Δ* y *mutPste9* salen de quiescencia y entran en proliferación tras unas 6 horas en medio fresco y el cultivo vuelve a alcanzar la saturación aproximadamente a las 22 horas. Por el contrario, las células *reb1Δ* fueron incapaces de reentrar en proliferación durante todo el tiempo que duró el experimento.

Seguidamente estudiamos mediante citometría de flujo la salida desde proliferación a quiescencia de células wt y *reb1Δ*, tanto en medio rico como en medio mínimo (Figura 12D). Tanto las células wt como las *reb1Δ* abandonan el ciclo en YES con un contenido en DNA 2C, equivalente a G2 (T0), como ya se había descrito previamente (Costello et al., 1986), y mayoritariamente se mantienen con ese contenido a lo largo del tiempo que permanecieron en quiescencia (T1 a T4). Sin embargo, en MM las células wt abandonan el ciclo con un contenido 1C ó 2C (T0), correspondiente a G1 y G2, respectivamente, en una proporción que no varía significativamente con el tiempo en quiescencia (T1 a T4). En los mutantes *reb1Δ* en MM la proporción de células que abandonan proliferación con un contenido de DNA correspondiente a G1 (1C) es menor y su aparición más lenta, comparada con las células wt, sobre todo en T0. Sin embargo, la diferencia mayor es que tras tres y cuatro días en

RESULTADOS

quiescencia, en las células *reb1Δ* aparece una población importante de células con un contenido de DNA inferior a 1C, indicativo de muerte celular (señalada con flechas rojas en la Figura 12D), que no se observa en las células wt.



RESULTADOS

Figura 12. La proteína Reb1 es necesaria para la supervivencia de las células quiescentes. **A.** Ensayo de crecimiento mediante diluciones seriadas de las células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) después de varios tiempos en saturación en MM y en YES. T0 denota el día en el que las células alcanzan la saturación, T1 corresponde 24 horas después de T0). **B.** Estudio de la reentrada en proliferación en medio líquido de células wt (972), *ste9Δ* (LR3), *reb1Δ* (D9P) y *mutPste9* (LR4P) tras 96 horas en saturación en MM (T4). Las células se crecieron en MM a 30°C hasta saturación y una vez alcanzado el periodo T4 se reinocularon en medio mínimo fresco. El estudio del crecimiento se realizó midiendo la densidad óptica a 595 nm a los tiempos indicados en abscisas y transformando este valor a número de células por ml ($1OD_{595} = 2 \times 10^7$ células/ml). **C.** Ensayo de diluciones seriadas de las células estudiadas en B. Una vez alcanzada la saturación (T0) y 4 días después (T4), se sembraron en medio rico YES y se incubaron a 30°C. **D.** Análisis por citometría de flujo del contenido de DNA de cultivos de células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) durante distintos tiempos de saturación en YES y MM. Se partió de cultivos en crecimiento exponencial en los medios indicados (Exp) que se llevaron a saturación durante los tiempos indicados. Las flechas rojas muestran la aparición de un gran número de células con un contenido en DNA inferior a 1C, indicativo de muerte celular. **E.** Electroforesis en campo pulsado (PFGE) para el estudio de los cromosomas de las células crecidas en YES y analizadas en D. **F.** PFGE para el estudio de los cromosomas de las células crecidas en MM y analizadas en D. Las calles 7 a 9 y 16 a 18 corresponden a células procedentes del cultivo T4 tras 2, 4 y 6 horas, respectivamente, de su transferencia a MM fresco. El asterisco rojo muestra un artefacto del gel debido a un exceso de agarosa para sellar los pocillos que distorsionó la movilidad del cromosoma I. La flecha roja marca el punto a partir del que observamos la desaparición de los cromosomas de la estirpe *reb1Δ*.

Para estudiar la procedencia de esta población de células con un contenido de DNA <1C, analizamos mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) la integridad de los cromosomas de las células procedentes de los mismos cultivos analizados por citometría. Los resultados se muestran en la Figura 12E y F.

Se puede observar que en el mutante *reb1Δ*, a partir de 2 días después de entrar en saturación, los cromosomas no son visibles (calle 13 flecha roja) y aparece una señal en la parte inferior del gel correspondiente a DNA de más pequeño tamaño. La observación de DNA de tamaño pequeño (observado también en electroforesis estándar no mostradas) permite descartar que la ausencia de cromosomas intactos visibles en geles PFGE se deba a que el DNA se encuentra en replicación activa, lo que es conocido por prevenir la entrada de los cromosomas en el gel como consecuencia de la presencia de burbujas de replicación. Estas mismas células cultivadas en MM y analizadas por citometría y PFGE fueron también

RESULTADOS

observadas al microscopio de fluorescencia tras la tinción de los núcleos con DAPI (Figura 13). A partir de 2 horas después de alcanzar la saturación (T2) se observó un número importante de células anucleadas (flechas rojas). Junto con los resultados anteriores, esto es interpretado como consecuencia de la pérdida de la integridad del DNA genómico. Cuando reinoculamos en medio fresco células wt y *reb1Δ* que han permanecido hasta T4 en quiescencia, se observa que la población inicial de células *reb1Δ* muertas, con un contenido de DNA inferior a 1C (Figura 14A, la flecha roja), se hace progresivamente más abundante, hasta que prácticamente todas las células son de esta naturaleza al cabo de 3 y 6 horas. Datos no mostrados indican que a tiempos más cortos de permanencia en quiescencia, como T2, cuando las células son reinoculadas en MM fresco e intentaron reentrar en proliferación, pierden igualmente su núcleo de manera similar.

Estudios previos (Roux et al., 2006) mostraron que el envejecimiento cronológico (pérdida de viabilidad durante la fase estacionaria) de células silvestres de *S. pombe* es mucho menos acusado cuando las células permanecen en quiescencia en MM que cuando lo hacen en medio rico. En el caso de las células *reb1Δ*, tras permanecer 2 días en quiescencia (T2) apenas el 5 % de las células en el cultivo son capaces de formar colonias. Porcentaje muy inferior a lo observado en células wt (datos no mostrados). Los ensayos de formación de colonias en placas nos dan idea de aquellas células que son capaces de proliferar y formar una colonia (unidades formadoras de colonias). Estos ensayos se complementan con el ensayo de floxina B, que detecta células muertas de forma directa. La floxina B es una sustancia fluorescente que cuando se añade al medio penetra de manera pasiva en el interior de las células y solo aquellas que son metabólicamente activas son capaces de expulsarla. De esta forma, la retención de fluorescencia tras el lavado de las células se emplea como un marcador de células muertas (Kucsera et al., 2000; Noda, 2008; Roux et al., 2006). En la Figura 14B observamos claramente cómo las células *reb1Δ* que han permanecido en quiescencia 72 h en MM (T2), retienen eficazmente el colorante, comparado con las células wt y *ste9Δ*.

RESULTADOS

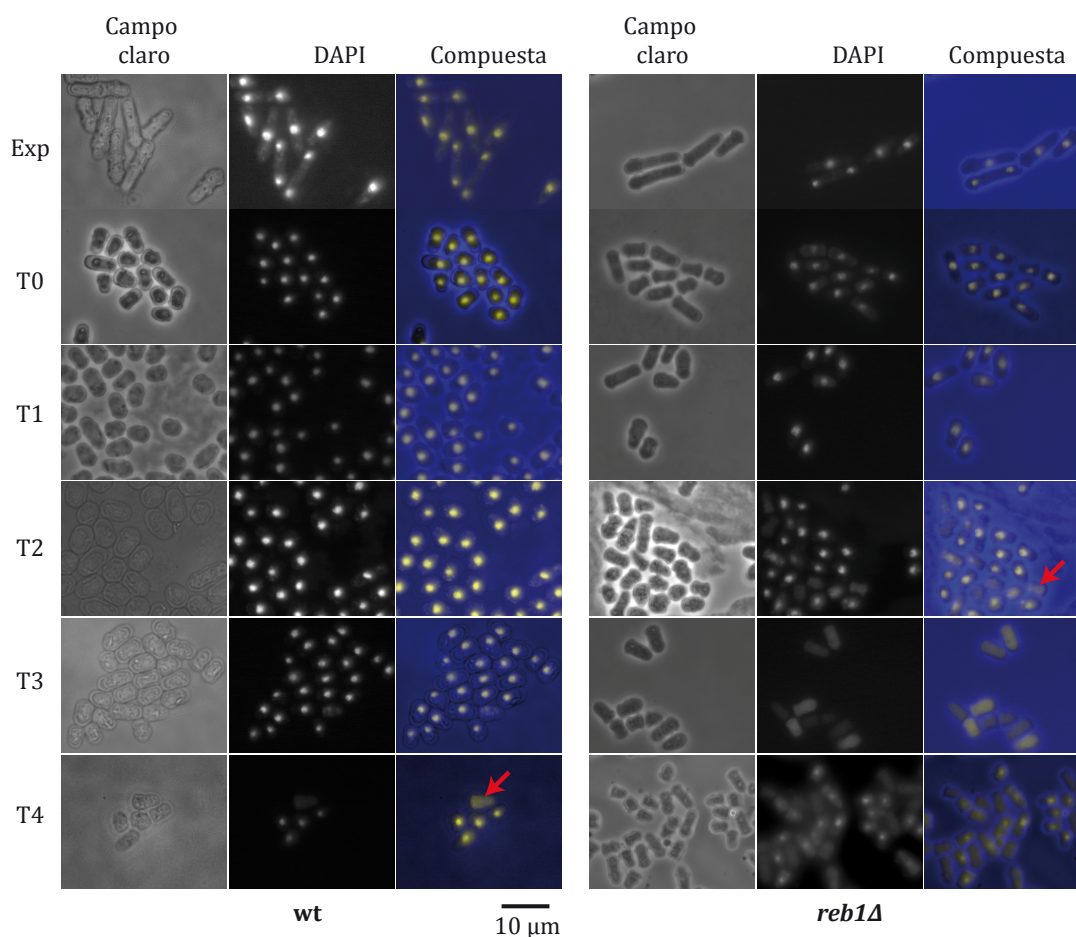


Figura 13. Aparición de células anucleadas en cultivos saturados de células *reb1Δ*. Tinción con DAPI de células *wt* (972) y *reb1Δ* (D9P) en crecimiento exponencial (Exp) y durante la saturación en MM. Los cultivos en crecimiento exponencial en MM se llevaron a saturación y en los distintos tiempos se recogió 1 ml de células que se fijaron con etanol 70% para su posterior tinción con DAPI y observación al microscopio de fluorescencia. En las células deficientes para Reb1 se observa aparición de células anucleadas (flecha roja) en tiempos de saturación a partir de T2.

Teniendo en cuenta todos los resultados expuestos en este apartado, podemos concluir que la proteína Reb1 es necesaria para evitar un envejecimiento cronológico prematuro cuando las células entran en quiescencia en MM. Si carecen de esta proteína, las células mueren rápidamente tras pasar a la fase estacionaria y no son incapaces de reentrar en el ciclo cuando son inoculadas en medio fresco. Además, parece que aquellas células que no han muerto durante la quiescencia lo hacen en su intento de reentrar en ciclo.

RESULTADOS

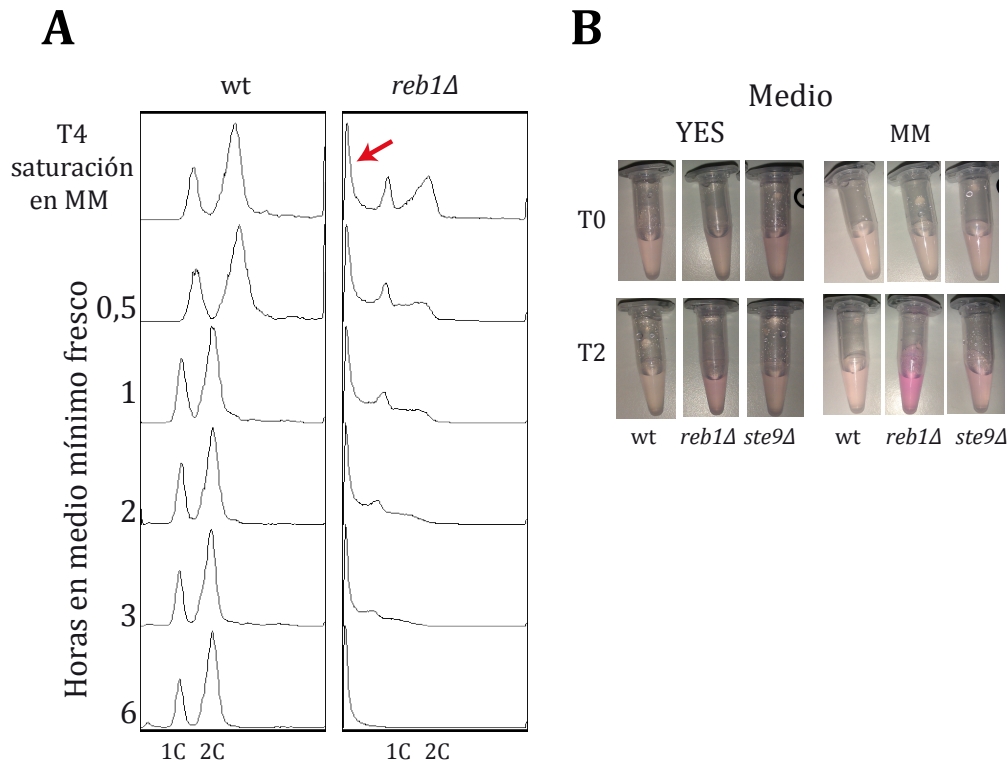


Figura 14. En ausencia de la proteína Reb1 la muerte celular continua cuando las células quiescentes se transfieren a medio fresco. A. Citometría de flujo del contenido de DNA de células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) que tras haber permanecido en fase estacionaria en MM hasta T4 fueron reinoculadas en medio fresco durante las horas indicadas. La flecha roja indica que antes de la reinoculación en medio fresco los cultivos *reb1Δ* ya presentan una población importante de células con un contenido en DNA inferior a 1C. **B.** Tinción con el colorante vital Floxina B de células wt (972), *reb1Δ* (D9P) y *ste9Δ* (LR3) que fueron llevadas a saturación en YES o en MM hasta los tiempos T0 y T2. Se añadieron 5 µg/ml de Floxina B a 2×10^7 células y se incubaron 15 minutos a 30 °C. Se lavaron con 1 ml de agua y se incubaron 5 minutos a 30°C. Finalmente, se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de agua, momento en el que se tomaron las fotos.

Como se ha mencionado previamente, durante la fase G1 del ciclo celular, que es de corta duración en *S. pombe*, las células toman la decisión de continuar en el ciclo proliferativo mitótico o entrar en diferenciación sexual (Figura 1). Para la toma de esta decisión, la presencia de ciertos nutrientes en el medio es crítica. En ausencia de fuente de nitrógeno, las células cesan de proliferar y entran en la vía de diferenciación sexual para conjugarse con células de tipo de apareamiento contrario y desarrollar una meiosis. El grupo de Mitsuhiro Yanagida definió una tercera vía alternativa de quiescencia G0, inducida por ayuno de nitrógeno en células heterotálicas (Su et al., 1996). En este estadio, las células presentan peculiaridades morfológicas, un complemento de DNA no replicado característico de la fase

RESULTADOS

G1 y resistencia a estrés térmico. Además, permanecen metabólicamente activas aunque han cesado de proliferar, ya que para su mantenimiento es necesaria la presencia de glucosa en el medio. De hecho estas células permanecen viables durante más de un mes, siempre y cuando se les vaya renovando el medio sin nitrógeno (Sajiki et al., 2009). Cuando se elimina el nitrógeno del medio de un cultivo en crecimiento exponencial, las células wt se dividen 2 veces antes de cesar su proliferación y adquirir las características de células quiescentes.

Debido a la baja viabilidad celular que observamos en la fase estacionaria de las células *reb1Δ* en MM y puesto que éstas células presentan una parada deficiente en G1 cuando se someten a ayuno de nitrógeno, realizamos un estudio de la supervivencia de las células *reb1Δ* sometidas a ayuno de nitrógeno prolongado. En primer lugar se sometieron a ayuno células wt y *reb1Δ* durante tiempos cortos (de 0 a 6 h) y durante 4 días (96h) y estudiamos su contenido de DNA mediante citometría de flujo (Figura 15A). Como ya habíamos observado anterior mente, las células *reb1Δ* presentan una parada ineficiente en G1 a lo largo de la primeras 6 h, que se mantuvo al cabo de las 96 h de ayuno. Para comprobar si la ausencia de Reb1 afectaba a la viabilidad de las células quiescentes por ayuno de nitrógeno, estudiamos la reentrada en ciclo de las células wt y *reb1Δ* sometidas a ayuno durante 96 h, mediante ensayo de crecimiento de diluciones seriadas en placa y mediante inoculación en medio líquido fresco YES y MM. Como se observa en la Figura 15B y D, las células que carecen de Reb1 reentran en proliferación de manera similar a las wt. Por otra parte, La aparición del perfil característico de crecimiento exponencial de *S. pombe*, con un pico principal de células 2C, ocurre a las 4-6 h en YES y a las 6-8 h en MM (Figura 15C). Este perfil es alcanzado antes por las células *reb1Δ* (4 h en YES y 6 h en MM) que por las wt (6 h en YES y 8 h en MM), probablemente debido a que en *reb1Δ* ya existe una población importante de células 2C cuando se transfieren a medio fresco (hora 0).

RESULTADOS

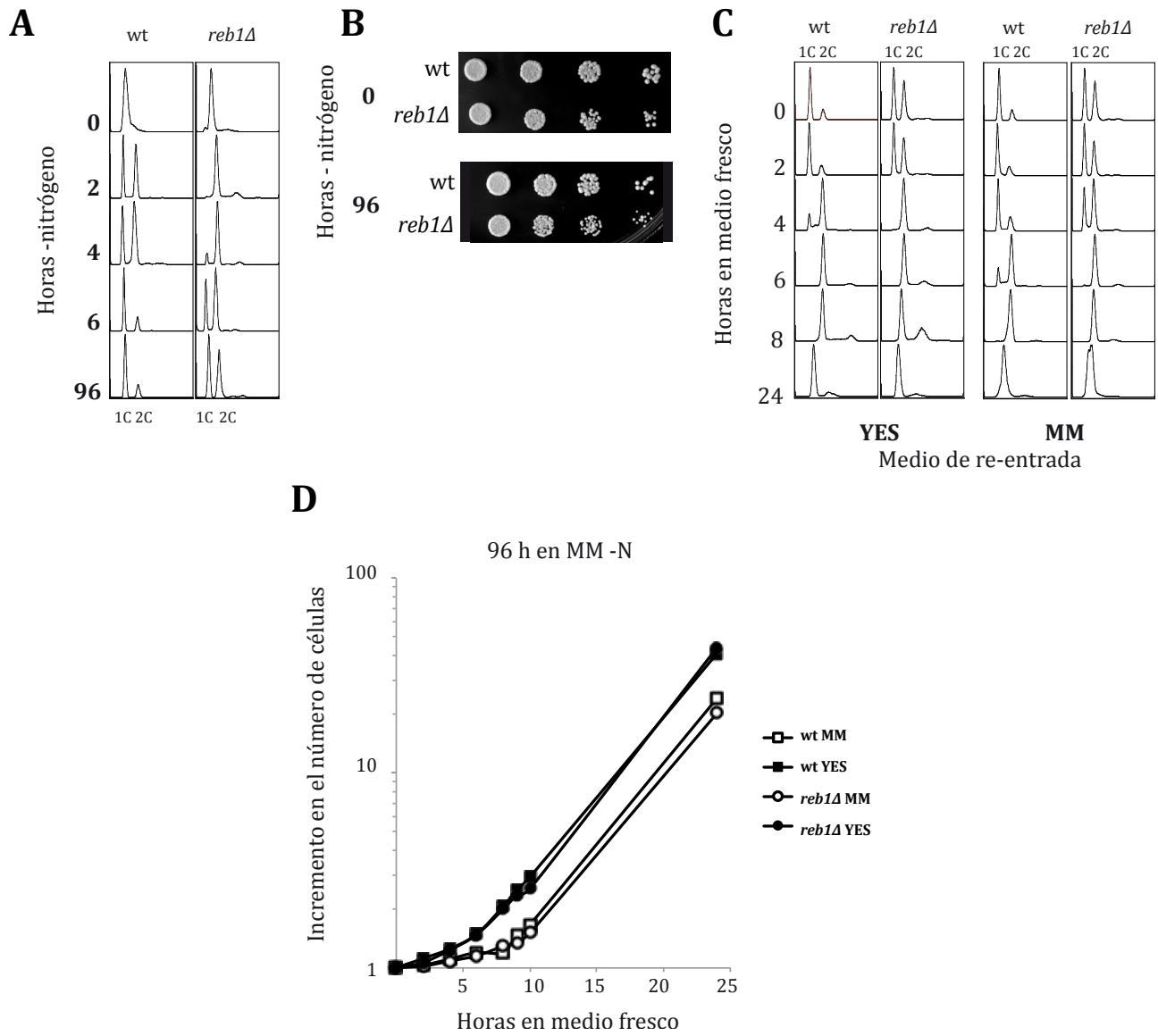


Figura 15. El ayuno de nitrógeno prolongado no reduce la viabilidad de las células *reb1Δ*. **A.** Estudio por citometría de flujo del contenido de DNA de células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) durante un ayuno de nitrógeno prolongado. Las células se crecieron hasta fase exponencial ($OD_{595} = 0,5$) en MM, momento en el que se lavaron 4 veces en MM-N y se resuspendieron en el mismo volumen de MM-N. En los tiempos indicados se recogieron células y se procesaron para su análisis por citometría de flujo teñidas con *Sytox green*. **B.** Análisis por diluciones seriadas en placas YES de la reentrada en proliferación de las células wt y *reb1Δ* tras un ayuno de 0 y 96 h. **C.** Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo de las células wt y *reb1Δ* durante la reentrada en proliferación tras ser sometidas a un ayuno de nitrógeno prolongado de 96 h. **D.** Análisis de la capacidad de reentrada en proliferación de las células wt y *reb1Δ* tras 96 h de ayuno de nitrógeno mediante su inoculación de MM y YES frescos.

RESULTADOS

4.2. Caracterización de la proteína Reb1

Como se ha descrito anteriormente, hemos comprobado que Reb1 se requiere para la sobreexpresión de *ste9+* que se produce en ayuno de nitrógeno, participando así a la parada en G1 necesaria para la diferenciación sexual. Sin embargo, esto no parece ocurrir por la unión de Reb1 al promotor como repuesta al ayuno, dado que Reb1 se halla unida al promotor de *ste9+* tanto en células bajo ayuno como en medio completo. Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para tratar de comprender a través de qué mecanismos Reb1 promueve la sobreexpresión de *ste9+* y la parada en G1 bajo estrés nutricional.

4.2.1. Reb1 presenta varias isoformas y se procesa durante el ayuno de nitrógeno

Sirviéndonos de una estirpe en la que fusionamos el epítipo 13Myc a la proteína Reb1, comprobamos mediante *western blots* que en el transcurso del ayuno de nitrógeno, Reb1 sufre un procesamiento post-traducciona que lleva a la aparición de formas de Reb1 de mayor movilidad electroforética a la esperada. Hemos denominado a estas isoformas: A (tamaño completo), B* y B (de tamaño intermedio) y C (de tamaño más pequeño) (Figura 16A). Se obtuvieron resultados similares utilizando una estirpe isogénica con Reb1 fusionado a 3HA, indicando que el procesamiento no está promovido por el epítipo empleado.

La proteína ortóloga de Reb1 en ratón de 130 kDa, mTTF-1, se aísla como un grupo de polipéptidos de menor tamaño (Smid et al., 1992). Como también hemos comprobado el caso de Reb1, la aparición de estos péptidos de menor tamaño de mTTF-1 no pudo prevenirse mediante el uso de ningún cóctel de inhibidores de proteasas durante la extracción de las proteínas, indicando que el procesamiento ocurre *in vivo* (Smid et al., 1992).

Las formas procesadas de mTTF-1 poseen una capacidad de unión al DNA mucho mayor que la proteína completa, debido a que estas formas carecen de un dominio amino-terminal de regulación negativa que bloquea los dominios Myb de unión al DNA situados hacia el extremo carboxílico (Evers et al., 1995; Nemeth et al., 2004; Sander et al., 1996). La proteína TIP5 (una

RESULTADOS

subunidad reguladora del complejo nucleolar de remodelación de la cromatina NoRC) interactúa con la región de autoinhibición de TTF-I y libera a los dominios Myb permitiendo la unión de esta proteína al rDNA y favoreciendo el reclutamiento del complejo NoRC al promotor del rDNA, hecho que posibilita el silenciamiento de la transcripción de estos genes. La existencia de varios dominios funcionales en Reb1 y la observación de varias isoformas de esta proteína, de manera similar a su ortólogo murino mTTF-1, sugería que Reb1 podría regularse a través de mecanismos similares.

4.2.1.1. Las isoformas de reb1 no se deben a un procesamiento alternativo de sus intrones

La aparición de las distintas isoformas de Reb1 durante el ayuno de nitrógeno podría deberse a la presencia de sitios alternativos de iniciación de la traducción o a modificaciones post-transcripcionales, como *splicing* alternativo, puesto que el gen *reb1*⁺ contiene dos pequeños intrones en su secuencia codificante (Figura 16B).

Para comprobar esta hipótesis se hizo un estudio del procesamiento de los intrones de *reb1*⁺. Para ello se realizaron RT-PCR a partir de RNA de células sometidas a distintos tiempos de ayuno usando cebadores que flanquean los intrones de la zona codificante (Figura 16B). Como se puede observar en las Figuras 16D en ninguno de los tiempos estudiados observamos diferencias en cuanto al procesamiento de los intrones y el tamaño de los productos de la PCR correspondió a los tamaños esperados para mRNA libre de intrones. El mRNA de *reb1*⁺ es, por tanto, procesado rápidamente tras su transcripción eliminando ambos intrones. Empleando los dos oligos externos, que flanquean ambos intrones y el exón 3, comprobamos que tampoco se produce exclusión de este exón a ningún tiempo de ayuno estudiado (Figura 16D, panel inferior).

Además, mediante *Northernblot* se comprobó la presencia de un único mRNA de Reb1 del tamaño correspondiente al transcrito completo, tanto en células en crecimiento exponencial como tras ayuno de nitrógeno (Figura 16C).

RESULTADOS

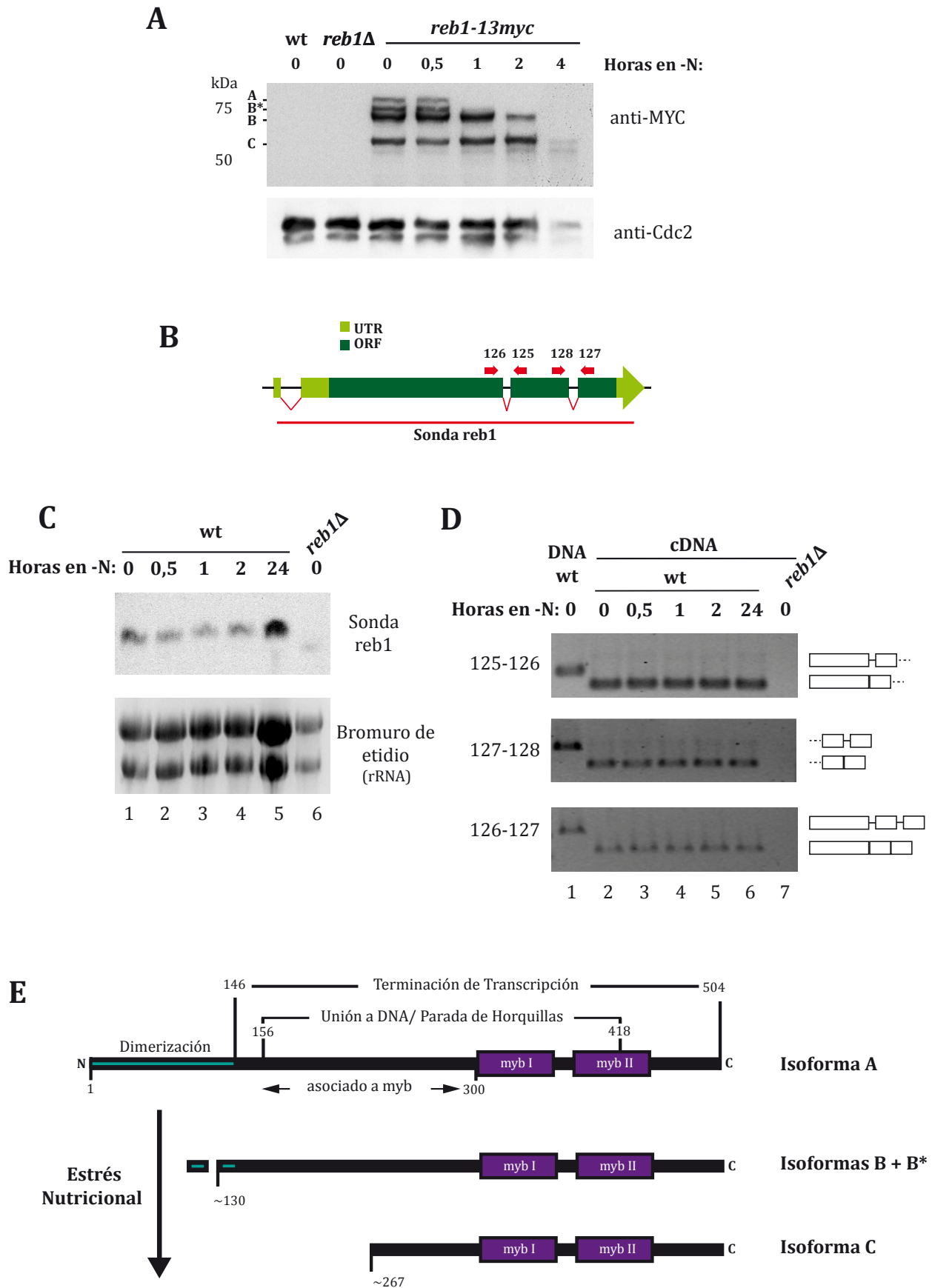


Figura 16. Reb1 presenta varias isoformas que no son debidas a un procesamiento alternativo de su mRNA. A. Western blot de proteínas procedentes de células sometidas a ayuno de nitrógeno. Se crecieron células

RESULTADOS

wt (972), *reb1Δ* (D9P) y *reb1-13myc* (ZG059) en MM hasta fase exponencial y se transfirieron a MM-N durante los tiempos indicados (h). Los extractos proteicos se separaron mediante SDS-PAGE. Una vez transferidos, se detectaron las isoformas de Reb1 mediante el anticuerpo mouse-anti-Myc-Tag de *Cell Signalling*. Se usó también el anticuerpo anti-PSTAIR para detectar la proteína Cdc2 utilizada como control de carga. **B.** Diagrama esquemático de *reb1+*, donde se representa la región codificante (verde oscuro), los extremos no traducidos del mensajero (UTR, verde claro) y los intrones (líneas rojas quebradas). **C.** Northern blot de RNA de células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) en ayuno de nitrógeno. Las células se trataron como en **A**, las muestras de RNA se separaron en un gel de agarosa con formaldehído. y tras la transferencia a nitrocelulosa, el mRNA de *ste9+* se detectó mediante una sonda específica marcada con digoxigenina que cubría todo el mRNA, incluyendo los UTR (indicada en **B**). Ha de tenerse en cuenta que la delección del gen *reb1+* en D9P no eliminó los extremos 5'y 3'-UTR del gen, como consecuencia se detecta una banda de un tamaño inferior al del mensajero de *reb1+* en la calle 6 ya que la sonda contiene los UTs. **D.** Análisis del *splicing* del mRNA de *reb1+*. El RNA de las células estudiadas en **C** se retrotranscribió con oligos al azar para su posterior análisis mediante PCR. Utilizando oligos de las regiones flanqueantes a los intrones (su posición se indica en **B**), se determinó su procesamiento. En el carril 1 se muestra un control de la PCR en el que se ha amplificado el DNA de la estirpe wt (972), por lo que observamos el tamaño de los productos que incluyen los intrones. No se muestran las PCRs hechas con el control de la DNAsa, porque en ninguna se obtuvo producto. En los diagramas de la derecha se muestra mediante cajas si la banda corresponde al mensajero con intrón (líneas que separan las cajas) o si corresponden al mensajero sin intrón (cajas pegadas). En el inferior se emplearon los dos oligos externos, que flanquean ambos intrones y el exón 3, comprobándose que no se produce exclusión exónica a ningún tiempo de ayuno de nitrógeno. **E.** Esquema representativo de los dominios funcionales de la proteína Reb1 (**adaptado de Biswas and Bastia, 2008**). En el esquema se muestra su posible procesamiento durante el ayuno de nitrógeno.

4.2.1.2. Un inicio alternativo de traducción no genera las distintas isoformas de Reb1

Puesto que las distintas isoformas de Reb1 observadas contienen todas el extremo C-terminal de la proteína (datos no mostrados señalan que no aparecen isoformas de distinto tamaño que solo contengan el extremo amino), al menos algunas de ellas podrían originarse por iniciación de la traducción en codones AUG alternativos del mRNA, más allá del AUG canónico. A este respecto, el codón 124 del mRNA de Reb1 codifica una metionina y la iniciación de la traducción a partir de él generaría una versión de Reb1 de un peso molecular semejante a la isoforma B (~45 kDa, sin considerar el epítipo). Por otra parte, la secuencia de aminoácidos alrededor de este residuo 124 de metionina (Asn**Ala**Met**Arg**AsnSer), guarda cierta similitud con la secuencia de la subunidad de cohesina Rad21/Securina (Glu**Ala**Gly**Arg**'AsnAla) que sufre un corte proteolítico por parte de Cut1/Separasa, para promover la segregación de las

RESULTADOS

cromátidas hermanas en anafase (Tomonaga et al., 2000). Por lo tanto, también consideramos la posibilidad de que la isoforma B pudiera ser el producto de un corte endoproteolítico en ese sitio por parte de Cut1 u otra proteasa con una especificidad similar. Puesto que el residuo Arg del sitio de Rad21 es esencial para su procesamiento por Cut1 (Tomonaga et al., 2000), para comprobar ambas hipótesis sustituimos los residuos Met124 y Arg125 por Cys y Glu, respectivamente (ver Material y Métodos).

Las proteínas de la estirpe resultante MR013 (*reb1-M124C-R125E-3HA*), así como de la estirpe de la que deriva, ZG001, usada como control positivo, se estudiaron mediante *Western blot*. Todas las isoformas aparecieron en las dos estirpes estudiadas aunque la isoforma A parece ser más abundante en estirpe mutante (datos no mostrados). Por lo tanto, los dos aminoácidos mutados no juegan un papel relevante en la generación de las isoformas de Reb1.

4.2.1.3.El medio de cultivo determina la abundancia relativa de las isoformas de Reb1

En la Figura 17A se muestran las formas de Reb1 que se detectan en células creciendo exponencialmente en medio rico YES y tras pasar estas células a MM completo. Al cambiar a MM, la forma completa A va desapareciendo progresivamente, siendo las formas más procesadas las únicas visibles a las 2 horas de cultivo en MM. Esto indica que alguna característica del MM señala para el procesamiento de la forma completa de Reb1. Ensayos no mostrados demostraron que la distinta concentración de glucosa como fuente de carbono (2% en MM y 3% en YES) no es responsable del fenómeno. También comprobamos que los suplementos que contiene el medio YES (adenina, uracilo, histidina, lisina y leucina) no impiden el procesamiento de la forma A cuando se añaden al MM.

RESULTADOS

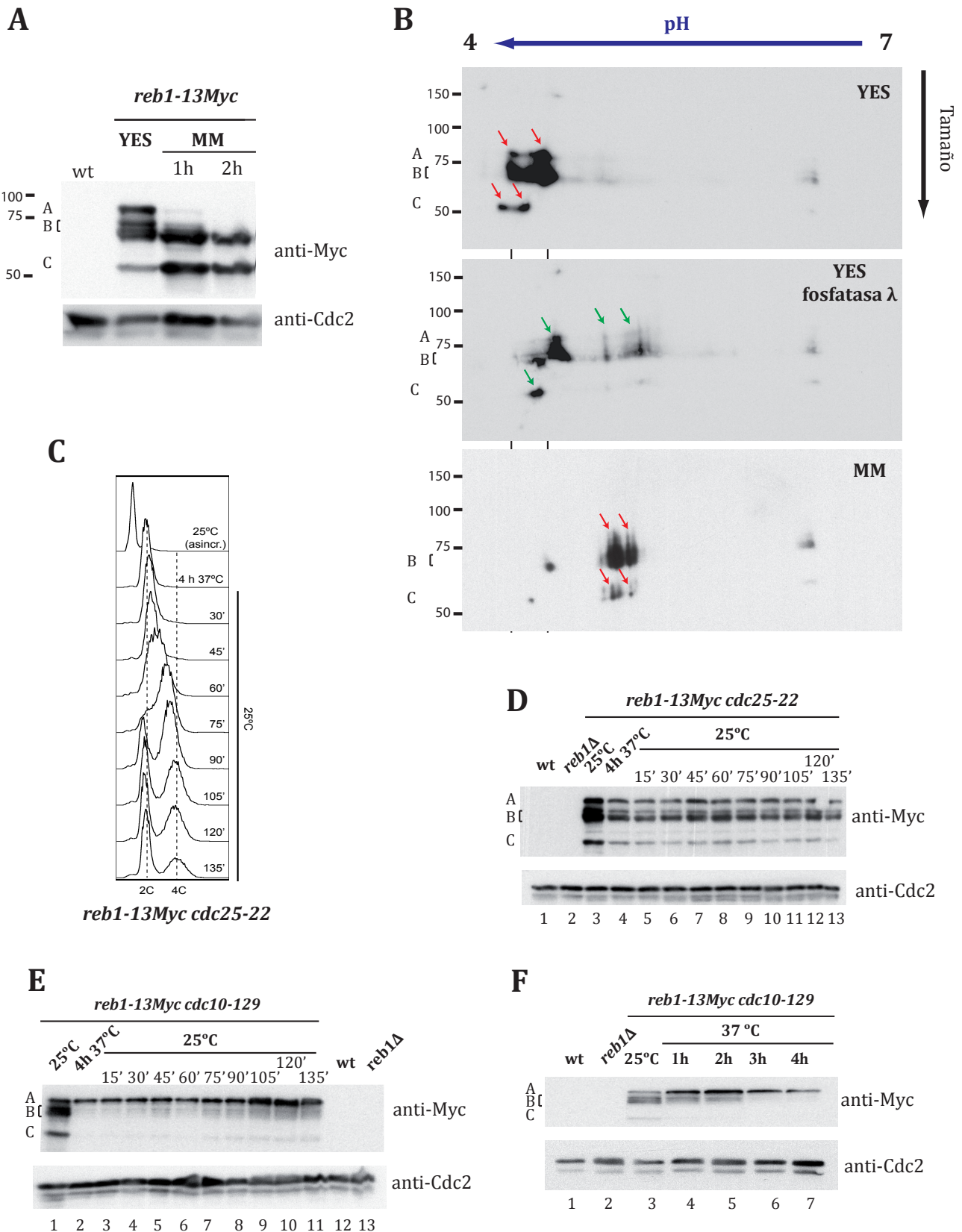


Figura 17. Reb1 varía de tamaño y de nivel de fosforilación en función del medio y del momento del ciclo.

A. Detección de las isoformas de Reb1 mediante *western blot*. Se crecieron células wt (972) y *reb1-13Myc* (ZG059) en YES hasta exponencial (OD=0,5) en YES. En este punto se tomaron muestras de células para la extracción de proteínas y el resto se lavaron con MM y se incubaron 1 ó 2 horas. Los extractos proteícos se corrieron en un gel de poliacrilamida y la detección de Reb1 se realizó con un anticuerpo *Mouse-anti-Myc-Tag* de

RESULTADOS

Cell Signalling. Como control de carga se detectó Cdc2 con anti-PSTAIR. **B.** Geles bidimensionales de proteínas de lisados de células *reb1-13Myc* crecidas en YES o MM. Una porción del extracto de células crecidas en YES se trató con fosfatasa de fago lambda (nótese que la desfosforilación puede ser parcial ya que se trata de extractos completos sin inmunoprecipitar). En la primera dimensión las proteínas se separan en función de su carga en un gradiente de pH de 4-7 y en la segunda dimensión en función de su masa. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF y la detección de Reb1 se llevó a cabo con el mismo anticuerpo. Las flechas rojas denotan la existencia de al menos dos poblaciones de proteínas con distinto nivel de fosforilación. Las flechas verdes manifiestan cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas tratadas con fosfatasa lambda. La flecha azul señala la inexistencia de las formas con mayores niveles de fosforilación en los extractos de células crecidas en MM. **C.** Estudio del contenido de DNA mediante citometría de flujo de células *reb1-13Myc cdc25-22* (MR043) sincronizadas. Las células se crecieron en YES a 25°C hasta fase exponencial media ($OD_{595} = 0,5$) y se transfirieron a 37°C durante 4 horas para sincronizar el cultivo en la fase G2. En ese momento se volvieron a cambiar a medio a 25°C para liberar las células del bloqueo en G2 y se analizaron cada 15 minutos durante 135 minutos. **D.** Estudio mediante *western blot* de las isoformas de Reb1 en las células analizadas en C (calles 3-13, la calle 5 corresponde a células a los 15 min de su liberación del bloqueo, no analizadas en C). Como controles negativos se analizaron también proteínas de células wt (972) y *reb1Δ* (D9P) crecidas en YES hasta fase logarítmica (calles 1 y 2). Como control de carga se utilizó anti-Cdc2 y para la detección de las isoformas de Reb1 se utilizó el anticuerpo *mouse-anti-Myc-Tag*. **E.** Caracterización de las isoformas de Reb1 en células sincronizadas en G1 mediante la mutación termosensible *cdc10-129*. El protocolo fue el mismo que el descrito en D, utilizando células *reb1-13Myc cdc10-129* (MR045). **F.** Análisis de las isoformas de Reb1 durante la sincronización en G1. La sincronización de las células estudiadas en E se estudió con más detalle, analizando extractos proteicos de células *reb1-13Myc cdc10-129* a lo largo de su sincronización a 37°C.

4.2.1.4. Las isoformas de Reb1 muestran un mayor nivel de fosforilación en medio rico que en medio mínimo

Consideramos la posibilidad de que la distinta movilidad electroforética observada para Reb1 pudiera deberse, al menos en parte, a algún tipo de modificación postraducciona, como fosforilación, cuyo nivel podría ser distinto en función de medio de cultivo. Para comprobarlo, llevamos a cabo el análisis de las proteínas de la estirpe Reb1-Myc mediante electroforesis bidimensional. La primera dimensión se desarrolló en un gradiente de pH, lo que permite separar distintas formas de una misma proteína con distinto punto isoelectrico ocasionado por un nivel diferente de fosforilación. En la segunda dimensión las proteínas se separaron en función de su masa (Figura 17B). Después de la transferencia, Reb1 se detectó con el anticuerpo anti-myc. De esta manera, aquellas formas de Reb1 de igual masa pero distinto punto isoelectrico aparecen como señales distribuidas en la misma línea horizontal. En el

RESULTADOS

panel superior de la Figura 17B, se puede ver que en YES todas la formas de Reb1 presentan, mayoritariamente, dos movilidades distintas en la primera dimensión, que corresponderían a dos niveles distintos de fosforilación (flechas rojas). Para comprobarlo, tratamos el extracto proteico completo con fosfatasa λ antes de su análisis electroforético (Araki et al., 2008; Stumpff et al., 2004), observándose un retraso de la movilidad de las formas de Reb1 durante la primera dimensión, indicando que han perdido parte de la carga negativa conferida por los grupos fosfato (Figura 17B, panel central, flechas verdes). Es bastante probable que la desfosforilación de Reb1 no haya sido completa, ya que se trataron con la fosfatasa λ extractos completos y no proteínas inmunoprecipitadas.

Cuando realizamos el mismo ensayo con los extractos de células crecidas en MM, comprobamos que, además de una mayor abundancia relativa de las isoformas de menor tamaño, éstas muestran niveles de fosforilación inferiores (Figura 17B, panel inferior, flechas) que las mismas formas de las células crecidas en YES.

Estos resultados indican que Reb1 sufre, al menos, dos tipos de modificación postraduccional: procesamiento proteolítico y fosforilación. Además, encontramos que, en ambos casos, la modificación es diferencial en función del medio de cultivo.

Se ha descrito que la proteína Reb1 de *S. cerevisiae* se encuentra fosforliada *in vivo* en residuos de serina (Ju et al., 1990; Morrow et al., 1990) y que, probablemente, esta fosforilación se debe a la acción de la caseína quinasa II. Esta enzima también fosforila la proteína *c-myb* en las células de mamífero. La fosforilación de *c-myb* hace que pierda afinidad por el DNA. En mamíferos esta quinasa interviene en la regulación de la transcripción del rRNA tras al estimulación mitogénica y juega un papel importante en la fosforilación de la RNA polimerasa I. Desconocemos por el momento cuál puede ser el papel de la fosforilación de Reb1 de *S. pombe* y la quinasa responsable de esta modificación.

No podemos descartar la posibilidad de que, al menos parte de la fosforilación de Reb1 que hemos observado, ocurra en el epítipo Myc usado para su detección en los geles 2D. Para

RESULTADOS

comprobarlo se requeriría un estudio más detallado. Sin embargo, en un análisis del proteoma de *S. pombe*, se ha encontrado fosforilación de Reb1 en células detenidas en metafase (Wilson-Grady et al., 2008).

4.2.1.5. Las células sincronizadas en la fase G1 solo contienen la isoforma de Reb1 de tamaño completo

La observación de distintas isoformas de Reb1 de distinto tamaño en cultivos asincrónicos, nos hizo pensar en la posibilidad de que éstas fuesen dependientes de la fase del ciclo. Para comprobarlo, estudiamos estas isoformas en cultivos sincrónicos de células termosensibles *cdc10-129* ó *cdc25-22*. La mayor parte de las células portadoras de estos alelos se encuentran detenidas sincrónicamente en las fases G1 y G2, respectivamente, tras cuatro horas del cambio de la temperatura del cultivo de 25°C a 37°C.

Como se observa en la Figura 17D, la abundancia relativa de las isoformas no parece variar cuando se sincronizan las células en G2 (calle 4), comparado con las formas visibles en el cultivo asincrónico (calle 3). Este patrón de isoformas permanece constante a lo largo del tiempo de liberación de las células desde G2 (calles 5-13). La sincronización de estas células *reb1-Myc cdc25-22* se comprobó midiendo el contenido de DNA por citometría de flujo (Figura 17C). Sin embargo, en las células sincronizadas en G1, justo antes de la entrada en replicación, observamos casi exclusivamente la isoforma completa A (Figura 17E, calle 2). En la Figura 17F (calles 3 a 7), donde se estudiaron las formas de Reb1 durante la sincronización, se ve que las formas más pequeñas desaparecen progresivamente a medida que las células se van deteniendo en G1, hasta que la forma completa A es prácticamente la única visible, coincidiendo con el momento en el que la mayor parte de las células están detenidas en G1 (ver el análisis por citometría de la sincronización en G1 de las células *cdc10-129*, Figura 11B, panel inferior, tercera columna). Durante la liberación de las células del bloqueo en G1 por cambio a la temperatura permisiva, van reapareciendo progresivamente las isoformas más

RESULTADOS

pequeñas (Figura 17E, calles 3-11), si bien al cabo de 135 min aún no se ha recuperado la misma abundancia relativa que en el cultivo asincrónico inicial (calles 1 y 11).

Una posible interpretación de estos resultados es que la expresión de algún gen que es regulado por MBF se requiere para el procesamiento de Reb1.

4.2.2. La expresión ectópica de las isoformas A y B revierte los fenotipos de las células *reb1Δ*

Para estudiar la función de las isoformas de Reb1 descritas, construimos una serie de plásmidos para expresar de manera controlada cada una de ellas, clonando las ORF correspondientes en el vector de expresión pREP42X, bajo el control del promotor *mtt1* (*no message in thiamine*) de intensidad media y reprimible por tiamina (Maundrell, 1993). Definimos la zona aproximada donde se procesa la proteína a partir de los tamaños de las formas de Reb1 estimadas en los *western blots*, clonamos la isoforma completa (IsoA) a partir de la secuencia completa del ORF de *reb1+*, la isoforma B (IsoB) se clonó eliminando los primeros 131 aminoácidos y la isoforma C (IsoC) eliminando los primeros 266 aminoácidos. Generamos mediante PCR las secuencias codificantes para cada una de las isoformas a partir del DNA una estirpe en la que Reb1 se marcó en su extremo carboxílico con el epítipo 3xHA. Estos plásmidos codifican para proteínas con una masa molecular de 64, 49 y 33 kDa respectivamente.

La expresión de la forma completa Reb1-IsoA generó todas las isoformas de Reb1 observadas anteriormente, por lo que Reb1 expresada ectópicamente es procesada de forma similar. Consistentemente, cuando se expresa la forma B (pREP-IsoB), se obtienen las formas B y C, mientras que cuando se expresa el vector con la pREP-IsoC solo observamos esta isoforma pequeña (Figura 18A). Utilizando estos plásmidos de expresión introducidos en la estirpe *reb1Δ ura4-D18* (MR003), estudiamos qué isoformas son capaces de revertir los fenotipos observados en las células que carecen de Reb1 descritos anteriormente: a) bajo crecimiento en MM; b) deficiencia en la parada en G1 bajo ayuno de nitrógeno; c) letalidad

RESULTADOS

sintética de las mutaciones *reb1Δ* y *wee1-125* a temperatura restrictiva; d) pérdida de capacidad de reentrada de las células en proliferación desde quiescencia. En el ensayo de diluciones seriadas de la Figura 18B se observa que la expresión de las formas A y B, pero no la expresión de la C, revierte, hasta niveles similares al control, el bajo crecimiento de las células *reb1Δ* en MM, sólo cuando el promotor *nmt1* está activo (- tiamina). A su vez, la expresión plasmídica de estas dos isoformas revierte el fenotipo de deficiencia de parada en G1 en ayuno de nitrógeno (Figura 18C). Tanto la expresión de la forma A y B rescata la letalidad del doble mutante *reb1Δ wee1-50* cuando se somete a temperatura restrictiva (Figura 18 D).

Como mencionamos en el apartado 5.4., Reb1 es necesaria para la supervivencia de las células durante la saturación en MM, como se puede apreciar en la figura 9 la sobreexpresión de las isoformas A y B durante la saturación recupera la viabilidad de las células incluso cuando durante la salida reprimimos la expresión de estas isoformas. Este es otro dato que nos confirma lo que sospechábamos previamente, que sobretodo Reb1 es necesaria durante la salida de ciclo en MM, aunque su expresión durante la reentrada aumenta la viabilidad de las células.

La sobreexpresión de estas dos isoformas también permite la recuperación de las RFBs 2 y 3 del rDNA que no están presentes en el mutante *reb1Δ* (datos no mostrados).

RESULTADOS

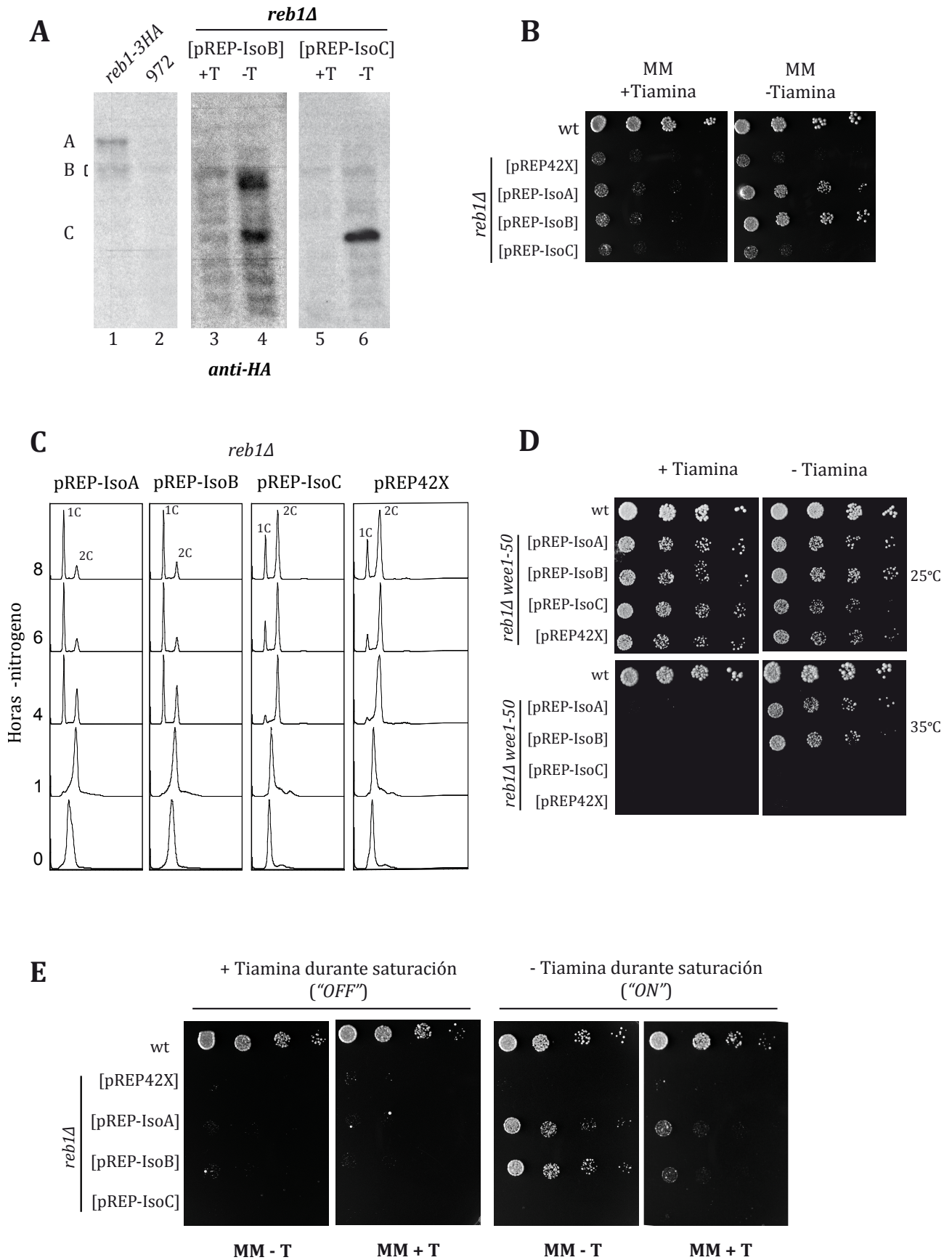


Figura 18. La expresión de las isoformas A y B de Reb1 revierte los fenotipos de las células *reb1Δ*. A. Expresión de las isoformas B y C de Reb1 fusionada a 3xHA en su extremo carboxílico en el vector de expresión media pREP42X, bajo el control del promotor reprimible por tiamina P42nmt1 (plásmidos pREP-IsoB y pREP-

RESULTADOS

IsoC). Las células *reb1Δ ura4-D18* (MR003), transformadas con cada uno de los vectores, se crecieron en MM con tiamina hasta fase exponencial temprana y se recogieron muestras para la extracción de proteínas. El resto del cultivo se lavó extensamente en MM sin tiamina y se resuspendió e incubó durante 16 horas en ese mismo medio para permitir la expresión de cada isoforma, detectadas con anti-HA. . **B.** Reversión del crecimiento lento de las células *reb1Δ* en MM. Se hicieron diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de las cepas wt (972) y *reb1Δ ura4-D18* (MR003), estas últimas transformadas con los plásmidos pREP42X (vector vacío), pREP-IsoA, pREP-IsoB o pREP-IsoC . Estas diluciones se sembraron en placas con MM con o sin tiamina y se incubaron a 30°C durante 3 días. **C.** Análisis mediante citometría de flujo de la distribución en el ciclo de cultivos en MM de las células *reb1Δ ura4-D18* (MR003) transformadas con los los plásmidos que se indican y sometidas a ayuno de nitrógeno durante los tiempos señalados. En todo el experimento las células se mantuvieron en ausencia de tiamina para permitir la expresión a partir de *Pnmt1*. **D.** Ensayo de diluciones seriadas de células wt (972) y *reb1Δ wee1-50 ura4-D18* (MR008) transformadas con los plásmidos indicados Se crecieron hasta fase exponencial en MM a 25°C con o sin tiamina y se sembraron en placas en el mismo medio. Las placas se incubaron a la temperatura permisiva de 25°C y a la restrictiva de 35°C. **(E)** Estudio de la viabilidad de células wt (972) y *reb1Δ ura4-D18* (MR003) transformadas con los plásmidos indicados. Las células se crecieron en MM con o sin tiamina hasta saturación (indicado en la parte superior) y se mantuvieron así durante 96 horas más. Seguidamente, se sembraron diluciones seriadas de estos cultivos en placas con MM con o sin tiamina (indicado en la parte inferior).

4.3.Reb1 interacciona con otras proteínas

4.3.1. Otras proteínas se unen junto con Reb1 al promotor de *ste9+* y se disocian al quitar el nitrógeno del medio

Los resultados del ChIP mostraron que Reb1 se encuentra unida al promotor de *ste9+* (*Pste9*) antes de que se produzca el ayuno de nitrógeno, por lo que la unión de Reb1 es necesaria pero no suficiente para la sobreexpresión de *ste9+* dependiente de ayuno de nitrógeno. Anteriormente ya hemos comentado que TTF1, el homólogo de mamíferos de Reb1, requiere de la unión de otras proteínas para poder ejercer su función como regulador transcripcional. Puesto que Reb1 presenta en su extremo amino terminal un dominio de dimerización, pensamos que este podría servirle además como de dominio de interacción con otras

RESULTADOS

proteínas. Estas proteínas podrían estar ejerciendo una acción reguladora sobre el complejo Reb1-*Pste9* permitiendo únicamente la expresión cíclica de *ste9+*. Una vez el nitrógeno desaparece del medio se liberarían permitiendo la expresión de *ste9* necesaria para la parada en G1 dependiente de *ste9+*. Para comprobar esta hipótesis decidimos llevar a cabo ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA *Electrophoretic Mobility Shift Assays*), en estos ensayos se hace una unión *in vitro* de extractos proteicos con la secuencia de DNA diana marcada radiactivamente (en este caso usamos como secuencia diana la secuencia de unión de Reb1 al promotor de *ste9* los 27 pares de bases desde las posiciones -198 a -160).

En la figura 19 A podemos observar la presencia de complejos *Pste9*-proteínas, la aparición de estos complejos es dependiente de la presencia de Reb1 ya en la calle 3 en la que Reb1 no está presente no se observa aparición de ningún complejo.

Quisimos comprobar si la variación en la composición de isoformas que depende del medio en el que están creciendo las células afecta a la formación de los complejos *Pste9*-proteínas. Para ello realizamos un experimento en el que creimos las células en YES, en el que están presentes todas las isoformas (Figura 19 B calles 1 y 6) y posteriormente se pasaron las células a MM o MM-N durante 1 o 2 horas (calles 2,3,7 y 8 y calles 4, 5, 9 y 10 respectivamente). En el recuadro de debajo de esta misma figura se observa un westernblot de células *reb1-13myc* sometidas a un paso de YES a MM-N durante 1 hora. Mediante estos dos experimentos observamos como al desaparecer la isoforma A tras pasar las células a MM desaparecen la mayoría de los complejos quedando solo aquellos de menor movilidad. Estos resultados nos hicieron pensar que los complejos de mayor movilidad podrían corresponder a formas monoméricas o truncadas de la proteína y aquellos complejos de menor movilidad podrían deberse a interacciones de Reb1 consigo misma o con otras proteínas a través de la región amino terminal.

RESULTADOS

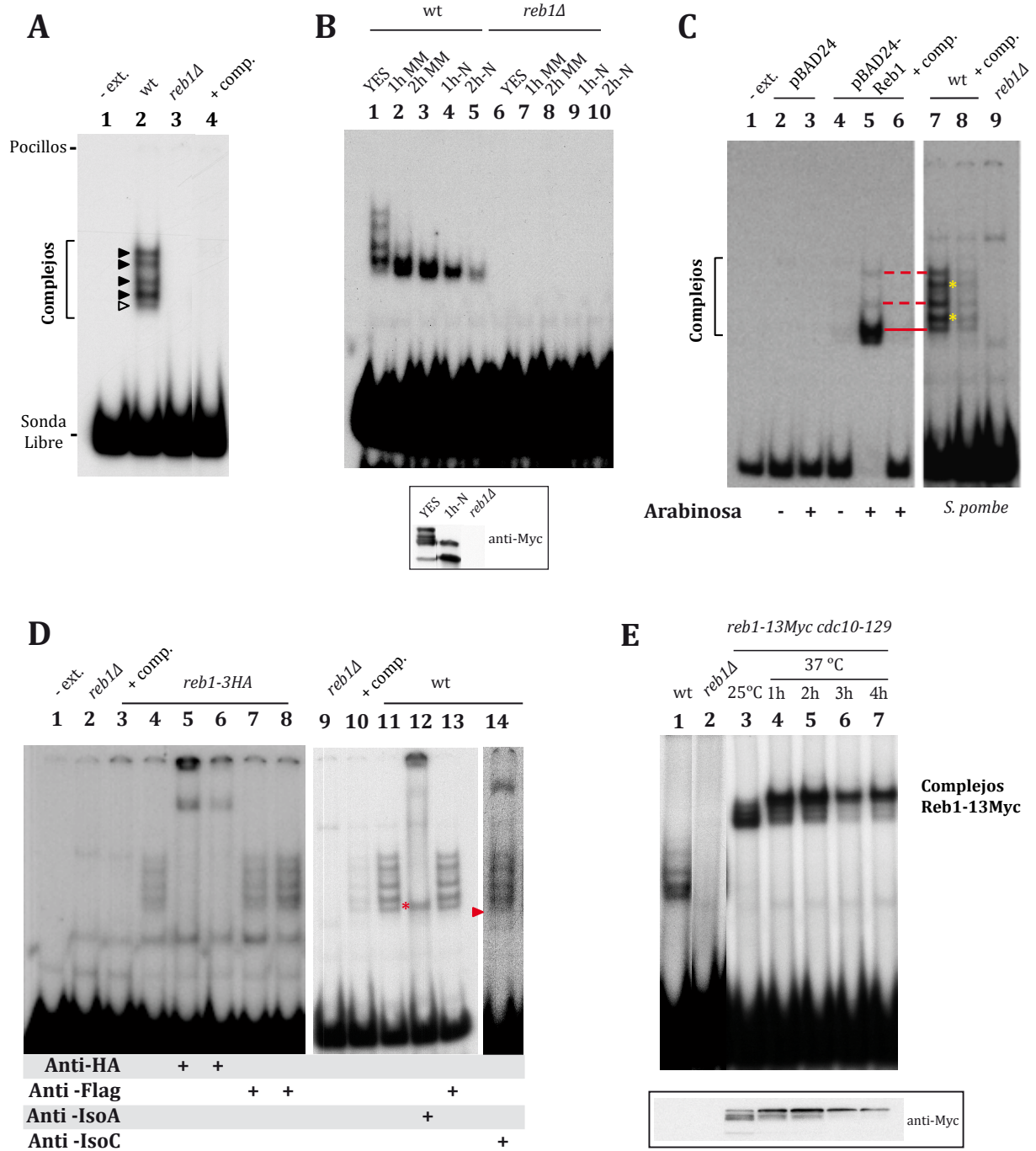


Figura 19. Reb1 se une al promotor de *ste9* formando varios complejos dependiendo del medio. **A.** Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) de extractos proteicos de células wt (972) y *reb1Δ* t (D9P). Como sonda se usó la secuencia del promotor de *ste9+* desde los nucleótidos -198 a -160. En los carriles 1-4 las células se crecieron en YES hasta fase exponencial. El carril 4 contiene el mismo extracto que el carril 2 más un competidor de sonda fría en exceso para comprobar la especificidad de los complejos. **B.** Ensayo EMSA) de extractos proteicos de células wt (972) y *reb1Δ* t (D9P) crecidas en YES hasta fase exponencial y posteriormente lavados 4 veces en MM o MM -N e incubados en estos medios durante 1 y 2 horas. En los carriles 6 a 10 se muestra la dependencia de la aparición de los complejos Reb1-Pste9 de la presencia de Reb1. En el recuadro de la derecha se muestran las distintas isoformas de Reb1 visualizadas por westernblot que se observan al realizar un ensayo similar al que han sufrido las muestras de los carriles 1 y 4 en células *reb1-13Myc* y muestras de una estirpe *reb1Δ* como la del carril 6. **C.** Análisis mediante EMSA de los complejos proteicos formados cuando se usa

RESULTADOS

como sonda la secuencia de *Pste9* sobre extractos proteicos obtenidos de células de *E. coli* (TOP10) transformadas con el vector de expresión vacío pBAD24 (2) o el vector para la expresión de Reb1 pBAD24-Reb1 (4 -6). Para inducir la expresión de la proteína a través del promotor *araBAD* las células se incubaron durante 2 horas en presencia de arabinosa. La especificidad de los complejos se comprobó añadiendo sonda competidora fría (6 y 8). En la calle 7 se muestran extractos de una estirpe wt (972) creciendo en YES. Los asteriscos denotan aquellos complejos que no son visibles en los extractos de *E. coli* por lo que son susceptibles de contener otras proteínas. **D.** EMSA + supershift (estudio de retraso en el retraso de la movilidad electroforética mediado por anticuerpo) de células con el gen *reb1* etiquetado con el epítipo HA *reb1-3HA* (MR020) con los anticuerpos anti-HA, anti-IsoA (generado en el laboratorio para reconocer un epítipo exclusivo de la Isoforma A), anti-IsoC (generado para reconocer un epítipo en el extremo C-ter presente en todas las isoformas) y con el anticuerpo inespecífico anti-Flag. Como control de especificidad se usaron extractos de *reb1Δ* (2 y 9) y sonda no marcada como competidora sobre los extractos de 4 y 11 (en 3 y 10). En la calle 5 el anticuerpo se añadió antes que la sonda y en la calle 6 se añadió primero la sonda y luego el anticuerpo anti-HA. El asterisco denota el único complejo visible en el supershift con anti-IsoA mientras que la punta de flecha marca el complejo que desaparece al añadir el anticuerpo anti-IsoC. **E.** EMSA para visualizar la evolución de los complejos durante la sincronización en G1 mediante el alelo termosensible *cdc10-129* en células *reb1-13Myc cdc10-129*. las células se incubaron en YES a 25°C hasta alcanzar una OD₅₉₅= 0,5 momento en el que se traspasaron a medio YES a 37°C. En los tiempos indicados se recogieron muestras para el análisis de sus proteínas. En el recuadro de debajo se puede observar la evolución de las isoformas durante la sincronización mediante un westernblot hibridado con un anticuerpo anti-MycTag. Estos complejos se ven más compactados debido al aumento de tamaño de Reb1-13Myc.

4.3.2. Reb1 puede polimerizar y unirse al promotor de *ste9+*

Puesto que Reb1 presenta un dominio de dimerización nos interesaba averiguar si los complejos proteína-*Pste9* estaban formados en exclusiva por la proteína Reb1 o si se debían a la interacción de Reb1 con otras proteínas, para ello procedimos al clonaje de Reb1 en un vector de expresión en *E. coli* (pBAD) inducible por arabinosa. En la figura 19 C se puede ver cómo en al menos 2 de los complejos (asteriscos amarillos) deben de intervenir otras proteínas de *S. pombe*, ya que la expresión de Reb1 en *E. coli* solo da como resultado los otros 3 complejos. Experimentos de expresión de Reb1p de *S. cerevisiae* en *E. coli*, sin embargo, solo da lugar a una única banda en ensayos de cambio de movilidad electroforética (Morrow et al., 1993). Hemos interpretado estos resultados como que el complejo *Pste9*-proteína de mayor movilidad estaría formado por Reb1 monomérica y los otros dos complejos observados en los extractos bacterianos estarían formados por posibles formas poliméricas de Reb1 unidas al

RESULTADOS

promotor de *ste9*. Para ahondar más en el conocimiento de la estructura de estos complejos decidimos realizar ensayos de Super-shift que consisten en la adición de anticuerpos en los ensayos de EMSA, si los anticuerpos presentan afinidad por alguna de las proteínas que forman parte de un complejo DNA-proteína se observará un retraso en la movilidad electroforética del complejo. Como se aprecia en la figura 19 D cuando se añade un anticuerpo anti-HA a los extractos proteicos de una estirpe que presenta Reb1 etiquetada con HA, se produce un retraso en la movilidad electroforética de todos los complejos (calles 5 y 6) independientemente de si el anticuerpo se añade antes (5) o después (6) de la formación de los complejos DNA-proteína, hecho que no sucede si se añade un anticuerpo inespecífico (calles 7 y 8).

Debido a la naturaleza de la proteína Reb1 que presenta varias isoformas nos preguntamos cuáles de estas isoformas estarían formando parte de los distintos complejos, para resolver esta cuestión se generaron en conejo unos anticuerpos para Reb1, siendo el anticuerpo anti-IsoA específico de la isoforma A y el anti IsoC es un anticuerpo que reconoce una región, del extremo carboxílico, presente en todas las isoformas. Al realizar los ensayos de super-shift con los anticuerpos específicos para la isoforma A observamos que se producía un retraso en la movilidad electroforética de todos los complejos menos el de mayor movilidad (asterisco rojo en la calle 12) mientras que cuando se utilizaba el anticuerpo anti-IsoC (calle 14) se observa exclusivamente retraso en el complejo de mayor movilidad. Estos resultados unidos al hecho de que tras una hora de ayuno de nitrógeno ya no se observa atisbos de la isoforma A (ver WB Figura 19 B) nos llevaron a concluir que el complejo de mayor movilidad electroforética está formado por una forma monomérica de Reb1 (las isoformas que están presentes en estas condiciones no presentan dominio de dimerización) y el resto de complejos estarían compuestos por la isoforma de Reb1 completa (la A) en conjunción con otras proteínas (como por ejemplo con ella misma, asteriscos amarillos de la calle 8 Figura 19 C).

RESULTADOS

Sirviéndonos de la estirpe con Reb1 etiquetada con 13myc y que presenta el alelo *cdc10-129* (de la que hemos hablado en el apartado 6.1.6) que permite sincronizar las células en G1 y que presenta una progresiva desaparición de las isoformas de menor tamaño según aumenta el tiempo a temperatura restrictiva, hicimos un ensayo EMSA. En la figura 19 E se aprecia el aumento paulatino del complejo *Pste9*-Proteínas de menor movilidad según aumenta la proporción relativa de la isoforma A de Reb1. Hemos de recordar que debido a que Reb1 se encuentra etiquetada con 13myc, su masa se ve aumentada por esta razón todos los complejos aparecen retrasados con respecto a la estirpe que wt en la que Reb1 se encuentra con su masa habitual. Previamente hemos hablado de que la isoforma A es la única que mantiene el dominio de dimerización por lo que era de esperar que aumentase la proporción de complejos en los que pudiésemos encontrar Reb1 polimérico.

4.3.3. Reb1 no interactúa con Bis1Δ en su unión al promotor de ste9

Hasta el comienzo de la escritura de este manuscrito la única interacción física con Reb1 descrita anteriormente era con la proteína Bis1 y esta interacción se describió mediante un ensayo de “*Yeast-two-hybrid*” (Taricani et al., 2002). Puesto que los ensayos de EMSA mostraron que debe de haber otras proteínas que se unen para formar los complejos Reb1-*Pste9* decidimos realizar un EMSA con una estirpe delecionada para el gen *bis1*. Como se observa en la figura 20 A en ausencia de Bis1 (4) se siguen formando todos los complejos. Por lo que al menos en el caso del ensayo *in vitro*, Reb1 no se une a Bis1 formando complejos con el promotor de *ste9*.

Durante el transcurso de la escritura de esta tesis se ha descrito una nueva interacción física de Reb1 con la proteína Cbf11 (Pancaldi et al., 2012), por lo que estamos realizando experimentos para comprobar esta interacción, pero un primer ensayo tipo EMSA, mostró (calle 5) que la ausencia de la proteína Cbf11 no parece afectar a la aparición de complejos *Pste9*-proteína.

RESULTADOS

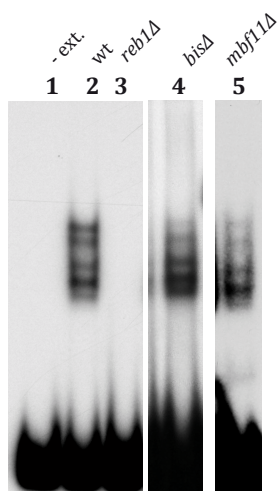


Figura 20. Las proteínas que se han descrito como de unión a Reb1 no participan en la formación de los complejos Reb1-Pste9. EMSA para el estudio de los complejos formados con proteínas candidatas a la formación de complejos ya que están descritas como de unión a Reb1. En el carril 4 se analizaron los complejos formados con el promotor de *ste9* en células que carecen de la proteína Bis1 proteína descrita que interacciona con Reb1 (Taricani et al., 2002). En el carril 5 se muestran los complejos formados con extractos de células que carecen de la proteína *cbf11*.

4.4. Implicaciones de Reb1 en otros tipos de estrés celular

Previamente ya habíamos observado la importancia de la proteína Reb1 en la respuesta al estrés nutricional como era el caso de su papel como factor transcripcional que participa en a respuesta al ayuno de nitrógeno decidimos indagar si esta proteína participa en la respuesta a otros tipos de estrés.

4.4.1. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo está causado por una acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive oxigen species). Estas ROS se generan por una reducción incompleta del oxígeno molecular debida en su mayor parte a procesos metabólicos, aunque también puede ser generada por agentes ambientales como son la exposición a la luz uv o la presencia de metales pesados en el medio. En la mayoría de las células la principal fuente de ROS es la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. El problema derivado de las ROS está en que son capaces de interactuar con todo tipo de biomoléculas desde los lípidos al DNA,

RESULTADOS

dañándolas e impidiendo su función. En última instancia llevan también a la acumulación de hierro (proveniente de proteínas) que puede producir mutaciones en el DNA.

Durante el envejecimiento celular (CLS) se ha observado que aumentan los niveles de ROS intracelulares, por lo que debido a que nuestros mutantes presentan una CLS muy baja en MM decidimos hacer un estudio más detallado.

Para ello inicialmente hicimos un estudio comparativo mediante diluciones seriadas de varias estirpes tanto en YES como en MM con el agente oxidante peróxido de hidrógeno, que produce un incremento rápido de los niveles intracelulares de ROS. Como se observa en la figura 21 A, en YES la adición de 1 mM de H₂O₂ al medio parece revertir la pequeña diferencia en crecimiento que se observa entre el wt y el mutante *reb1Δ*. Por el contrario en MM de nuevo observamos que los mutantes que carecen de la proteína Reb1 presentan una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno. Una vez más apreciamos que el fenotipo de estos mutantes varia en función del medio en que se encuentren las células, siendo siempre más sensibles al agente de estrés las células que carecen de la proteína Reb1 en medio mínimo que en YES. Esto nos hace pensar que Reb1 debe de estar participando en la regulación de algún tipo de respuesta a estrés específica de MM.

Durante la fase de crecimiento exponencial *S. cerevisiae* (a la que también se suele llamar levadura fermentadora) sufre el denominado “*efecto crabtree*” o de inhibición de respiración por glucosa, por el cual estas células solo son capaces de obtener su energía a través de la fermentación de los azúcares presentes en el medio. Por el contrario, *Schizosaccharomyces pombe* es una levadura que además de fermentar durante la fase de crecimiento exponencial también es capaz de respirar. Se ha comprobado que las tasas de respiración durante la fase de crecimiento logarítmico en la levadura de fisión varían en función del medio en el que estas están creciendo (Zuin *et al.*, 2008). Durante la fase exponencial de crecimiento en MM y 2% de glucosa *S. pombe* no solo fermenta la glucosa sino que también es capaz de respirarla (se

RESULTADOS

observa un incremento en la tasa de consumo de O₂) mientras que en medio rico YES con 3% de glucosa la tasa respiratoria es inferior.

Debido a las diferencias fenotípicas observadas en el mutante *reb1Δ* en los dos medios de cultivo empleados en esta tesis quisimos averiguar si estos mutantes presentaban deficiencias en su respiración. Realizamos un abordaje indirecto (no medimos los niveles de ROS) mediante el crecimiento de las células en medio mínimo en el que se favorece al máximo la respiración y además crecimos las células en una fuente de carbono no fermentable (como es el glicerol), de tal manera que forzamos al máximo la respiración en estas condiciones. Cuando forzamos al respiración, en principio, las células acumulan más ROS intracelulares por lo que deberían de ser más sensibles a agentes oxidantes externos, por ello volvimos a usar como agente oxidante H₂O₂ y esta vez utilizamos N-acetil-cisteína como antioxidante. En la figura 21 B podemos observar como cuando las células *reb1Δ* son cultivadas en YES con una fuente de carbono no fermentable (glicerol) su crecimiento se ve reducido (con respecto a las células wt), la adición de agentes oxidante o antioxidantes en estas condiciones no parece afectar en gran medida al crecimiento de las células. Sin embargo, cuando sembramos las células en medio mínimo con glucosa la adición de peróxido de hidrógeno hace que la viabilidad de todas las estirpes se vea reducida y la adición del agente antioxidante recupera el crecimiento hasta el estado de medio sin oxidantes. Cuando forzamos a las células mutantes a aumentar su tasa de respiración creciéndolas en MM con glicerol observamos que el crecimiento en ausencia de Reb1 está fuertemente afectado y que la adición de agentes oxidantes que aumentan significativamente la concentración de ROS intracelulares disminuye la viabilidad, al añadir el agente antioxidante se revierte parcialmente la letalidad. Todos estos resultados nos llevan a concluir que las células *reb1Δ* podrían presentar defectos en la ruta respiratoria o en los mecanismos de detoxificación que conlleven a un aumento de ROS intracelulares, lo que en última instancia lleva a un aumento de la letalidad celular.

RESULTADOS

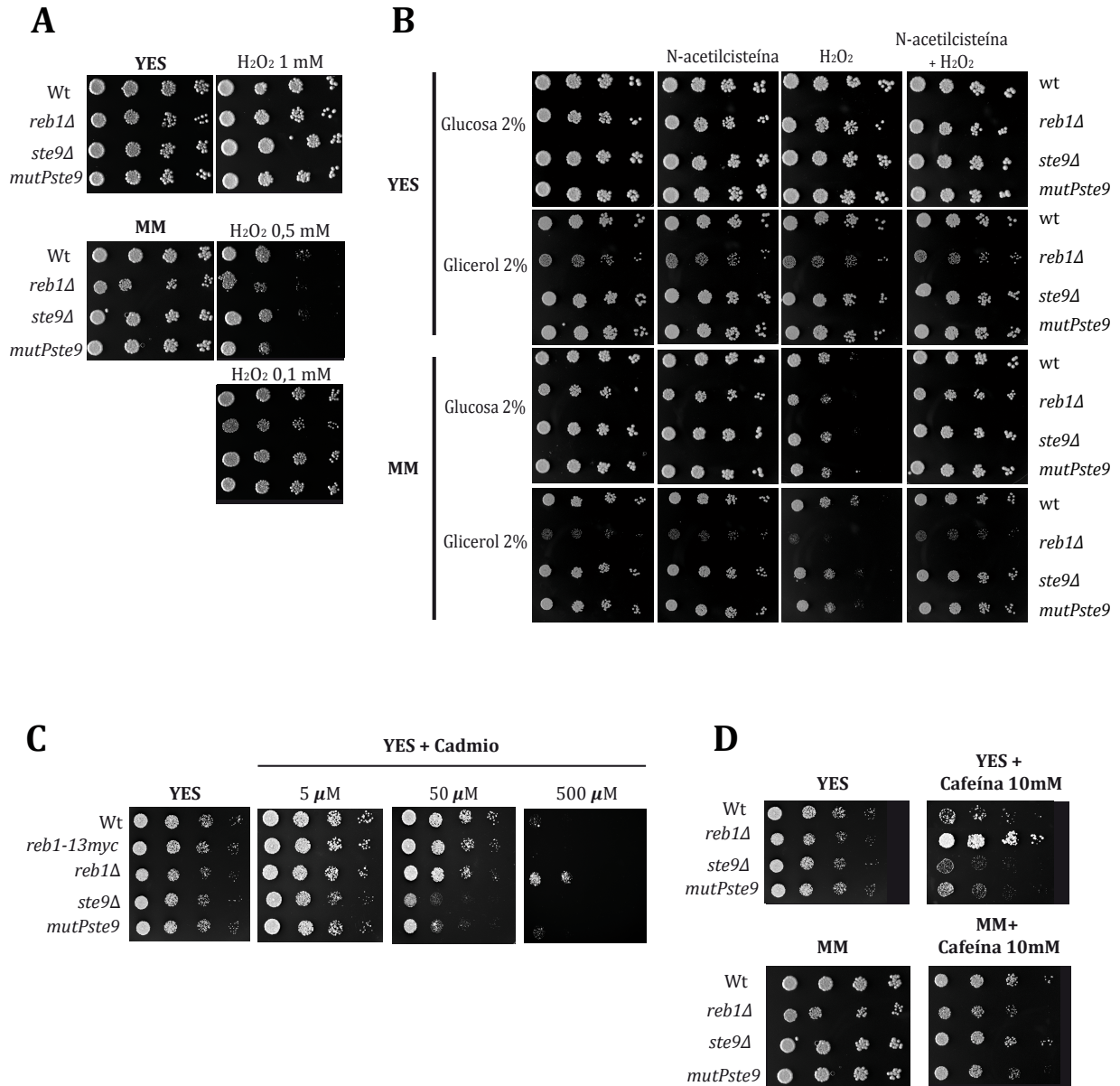


Figura 21. Las células deficientes en *reb1* muestran una mayor sensibilidad a agentes oxidativos. A. Estudio mediante diluciones seriadas de la sensibilidad a peróxido de hidrógeno de células wt (972), *reb1Δ* (D9P), *ste9Δ* (LR3) y *mutPste9* (LR4P). Las células se crecieron hasta fase exponencial y se sembraron en placas de YES o MM con las concentraciones indicadas de peróxido de hidrógeno. **B.** Estudio detallado de la sensibilidad a estrés oxidativo extrínseco e intrínseco de las células de (A). Se sembraron las células en medio YES o MM con dos fuentes de carbono distintas, con glucosa o glicerol (más glucosa al 0,2%). El glicerol no permite la fermentación fuerza a las células a respirar. Se añadieron a los medios los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno 0,5mM o antioxidantes N-acetilcisteína 400 μM. **C.** Estudio mediante diluciones seriadas de la sensibilidad al cadmio de células wt (972), *reb1Δ* (D9P), *ste9Δ* (LR3) y *mutPste9* (LR4P) en YES. **D.** Estudio mediante diluciones seriadas de la sensibilidad a la cafeína de células wt (972), *reb1Δ* (D9P), *ste9Δ* (LR3) y *mutPste9* (LR4P).

RESULTADOS

4.4.2. Estrés por metales pesados

Los metales pesados cuando se encuentran a grandes dosis pueden llegar a ser dañinos para las células, ya que pueden dañar las estructuras celulares y generar mutaciones en el DNA. El principal mecanismo de toxicidad de los metales pesados viene dado por la acumulación de ROS, ya que mediante una reacción química conocida como la reacción de Fenton se genera el radical hidroxilo (OH⁻) a partir de peróxido de hidrógeno. Este radical es el más dañino de todos los tipos de ROS ya que es altamente reactivo.

Analizamos la sensibilidad a cadmio de *reb1Δ* (Figura 21 C) y observamos que las células *reb1Δ* crecidas en YES son ligeramente más resistentes al cadmio que las células wt y parece que esta relacionado con la capacidad de controlar la expresión de *ste9* ya que en las células que carecen de *ste9* o que tienen la secuencia del promotor mutada la supervivencia es menor. En este caso estaríamos hablando de que Reb1 estaría regulando la expresión de *ste9* de manera negativa durante el estrés por cadmio, ya que si carecen de *ste9* se aumenta la letalidad. Se podría explicar la disminución de la viabilidad del mutante *mutpste9* debida a que en el promotor de *ste9* hay otro sitio de unión a Reb1 que podría estar evitando la expresión de este gen

4.4.3. Cafeína

La cafeína es una metil-xantina (análoga de las purinas) que actúa sobre múltiples dianas en las células eucariotas: altera el ciclo celular, actúa sobre proteínas clave para la regulación del ciclo y promueve la apoptosis. Afecta a los mecanismos de reparación y recombinación del DNA (entre otras cosas inhibe los checkpoint S-M y G2-M, promoviendo la activación de Cdc2 por desfosforilación (Bode and Dong, 2007)), altera la progresión del ciclo celular y perturba la homeostásis del AMPc. En animales se ha visto que induce condensación de cromatina cuando la replicación está bloqueada por la HU, también se ha visto que induce múltiples entradas en mitosis si la síntesis de DNA está bloqueada. Dependiendo de la concentración la cafeína muestra distintos efectos. Se ha visto que la cafeína ejerce su acción sobre diversas

RESULTADOS

rutas de señalización, inhibe algunas de las isoformas de la PI3 quinasa y componentes de su ruta como Akt, también parece que podría actuar sobre la señalización por p53, mTOR, DNA-PK y Chk1.

En *S. pombe* se ha visto que la cafeína reduce la tasa de mutación inducida por agentes de daño al DNA, promueve la entrada en mitosis de células sin replicar por medio de la desforforilación de Cdc2 (Wang et al., 1999), también se ha observado que la cafeína en *S. pombe* genera un retraso de la citocinesis (Kumada et al., 1996). En esta levadura no parece tener efectos sobre el proceso de replicación en si, las células paradas en S si son tratadas con cafeína comienzan a septar antes de replicar (generando una gran proporción de células con fenotipo “cut”) y pierden viabilidad rápidamente, incluso antes de la aparición de los septos. El efecto de la cafeína sobre los Checkpoints es a través de su interferencia sobre Rad3 (Moser et al., 2000)(Wang et al., 1999), inactivándola y previniendo la activación de las quinasas de Checkpoint Cds1 y Chk1.

En la figura 21 D se observa como los mutantes *reb1Δ* crecen mejor en presencia de cafeína que las células wt, siempre y cuando este estrés se de en medio rico.

Todos los estudios que hemos realizado hasta el momento nos vuelven a mostrar una clara diferencia de fenotipos de resistencia a estrés dependientes de la presencia de la proteína Reb1. Los datos parecen indicar que cuando las células carecen de Reb1 y están creciendo en medio rico podrían tener activado algún tipo de mecanismo de respuesta a estrés general que permite un mejor crecimiento de las células cuando estas son sometidas a distintos tipos de estrés, mientras que si las células están creciendo en MM la ausencia de Reb1 no produce la expresión de este mecanismo.

4.5. Estudios *Genome-wide* de Reb1

La acción que Reb1 ejerce sobre la expresión de *ste9* no explica todos los fenotipos que hemos descrito previamente en los mutantes *reb1Δ*, puesto que la proteína homóloga de *cerevisiae* es

RESULTADOS

un regulador transcripcional general decidimos realizar estudios de alto rendimiento a nivel de genoma completo para localizar otras posibles dianas de Reb1 en el genoma de *S. pombe*.

4.5.1. Estudio de los sitios de unión de Reb1 en el genoma de *S.pombe*: Chip-seq

La técnica de ChIP-seq (Furey, 2012; Schmidt et al., 2009) permite detectar las secuencias de DNA con las que interacciona una proteína de interés. Las proteínas se fijan al DNA mediante su unión covalente por medio de formaldehído. Posteriormente el DNA se fragmenta mediante disrupción por medio de sonicación y las proteínas de interés son capturadas por afinidad a un anticuerpo unido a una matriz. El DNA unido a estas proteínas es purificado y tras sucesivas rondas de amplificación se manda a secuenciar.

4.5.1.1. *Reb1 se une a múltiples regiones del genoma de S. pombe*

En nuestro caso utilizamos células de *reb1-TAP* crecidas hasta fase exponencial en MM, utilizando bolitas magnéticas unidas a proteína A fuimos capaces de inmunoprecipitar el DNA unido a Reb1 en estas condiciones. Realizamos un proceso de secuenciación masiva mediante el secuenciador de Illumina Hi-seq. Tras comprobar que la calidad de las secuencias era muy alta, mediante el test de calidad de FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) de Babraham bioinformatics, procedimos a su análisis mediante el software CLC genomics workbench 5.5.1..

Habiendo probado varias condiciones para la detección de los picos nos decantamos por el uso de unas restrictivas que detectan un menor número de falsos positivos. Para la realización del alineamiento de las secuencias fijamos los siguientes parámetros:

Coste de base errónea:	2
Coste de inserción:	3
Coste de delección:	3
Porcentaje de la secuencia que debe de alinear:	80%
Fracción de similitud:	0,8

RESULTADOS

Alineamiento: local

secuencias que alinean en más de una zona: distribuirlas al azar

De esta manera logramos alinear el 81% de las secuencias en el caso del control (wt) y el 91% de las secuencias en el caso de la estirpe problema *reb1-TAP* (ZG023), ver tabla 2.

	WT		reb1-TAP	
	Número	%	Número	%
Referencias	6	-	6	-
Secuencias alineadas	2801820	81	1590261	91
Secuencias NO alineadas	641758	19	153011	9
Total de secuencias	3443578	100	1743272	100

Tabla 2. Datos del alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación Hi-seq de Illumina de las muestras de ChIP-seq. Como control se usó una estirpe wt crecida en MM y como problema la estirpe ZG023 (*reb1-TAP*) también crecida hasta fase exponencial en MM.

Con las secuencias alineadas procedimos a la detección de los picos utilizando los siguientes parámetros:

1. Datos control: Alineamientos muestra wt
2. Detección de picos:
 - Tamaño de la ventana: 250
 - máximo FDR %: 5
3. Desplazamiento de lecturas: si
 - Longitud de los fragmentos: 200
4. Parámetros para la mejora de los picos:
 - Mejora de las fronteras: si
 - Filtrado de picos por orientación de lecturas:
 - por número: si 0,4
 - por distribución espacial si
 - probabilidad máxima 10^{-4}

Con estos parámetros se detectaron los 83 picos que se muestran en la siguiente tabla:

RESULTADOS

Pico n°	Cr	Posición	Longitud del pico (pb)	Secuencia
1	I	(17007..17075)	68	AGT AGGAAGGAGGAGAC ACAAAAATATAGTGTGAAACGTATTCTACTGTGTAGTGCGTTAATAAGAAT
2	I	(108540..108615)	75	GAAAGTTACAAGTGATACACCATAATAATGGTACTTACCCTTAGTATGACGCGTATTGTTTACTAAAGAAAAGAG
3	I	(283259..283333)	74	GTATTATCTTAGATCATTTAAGCCA TCCCAACCCTTACT CGCTAAGTGTTCCTTTATCCAAATTTGAAGGTC
4	I	(397061..397144)	83	AGAACTGCGGTGAGTTTTCCTTGTGATCTATTATATTACAATACACAGGTTGTATAAGTAGCAACTGAGTATAGGTATTGTAT
5	I	(686482..686538)	56	TT GCCCCACCCTTCCCT TATTGTTATGTGTATACGCAGGTAGGGTGAGCGAACGCAA
6	I	(1096432..1096525)	93	TCTGCCCGCGCAGGTTCAAATCCTGCTGGTGACGGTATTGTGCGCGGTAGGAGAGTGGAACTCCGACGGGCTCATAACCCGTAGGTCCCAGG
7	I	(1398363..1398511)	148	TTGCATTTCTGAATTAAACCGAAGGCTACGGATACAGCCAATGAATCGGATCTAAGTAATCTAAAATGTGCGGGAAAACCAATTATCACGGCCGCTATCAATAAAATTGAAGGTTCTGGTGAAAAATTTCTGTTATTACATTTATGAT
8	I	(1571717..1571781)	64	GTGTATTGCTGGTTGCTAGGCCACAAACCAACGAGGAGCTTGCACCAAACCTTTGAA GACCGT
9	I	(1675717..1675779)	62	AAATCAGTCTTAATGGACAGTGGTGAGAT GCACCACCCTTACCA AAGCTTTTTCAAAAGTCGG
10	I	(1725560..1725631)	71	TGTCCATTTTCTCTGGCATTTCGATGTTAACCGAA CAGTAAGGGGAGGGC ACTAGTTAGTCCACTTAATTT
11	I	(1835076..1835146)	70	GCCCGCGGTAGCGCCGCTCGAGAACATGCGT GCACGACCCCTTCCCC GCGACTTCGTAA GGTCTAAGAAGG
12	I	(2035707..2035786)	79	TTAAGTAGTGGATGGTAGCGTGAGTATATTAGATTTTCGTGACGCGTGAACGCGACGCGTCCGTGATCCATCATATGCA
13	I	(2106286..2106364)	78	CACATGGGTTTTTTCATGGTGTGGTCCTTTTAACCAATCAGATTGTAGGACGGTTTCTCAAATGACCGAGAAATGATT
14	I	(2396866..2396935)	69	TCTAAACGAGTATCCAAGTTACACAATCGTGTGAGTTCGAATTCGGTCTTGGCCAAAA CATTTCATGACG
15	I	(2398185..2398250)	65	CATTTCTGGCCTTGATCGAACTAACTCAGATTAGC GAGTAAGGGATAGGC TTTGTTT TTTATTTT
16	I	(2489981..2490045)	64	CCATGTCGGATTGGTCATACG AGGAAGGGTGTGGC AGAATACCTTGCGGTGGGCGG GTTTGTGA
17	I	(2682424..2682486)	62	CTGGAGGAGCGGATATAAGTGTTCAGAGTA GGGAAGGGTGGGGC ACTACTTGGACTTGATC
18	I	(2709640..2709713)	73	AAACGCTACACCAAAGCGCGCGCTCTAAAACACGCCAAAACGAGGTGCACGCAACTTAGCTTGCGCGAAAGCG
19	I	(3076857..3076915)	58	GCGAGTATGGTGCCTTATGACATCATTGATAACTGAGCTGGCTTTGCTACGTGACGT
20	I	(3478336..3478372)	36	TTAACGTTGTGTTTCGTGTCATTCTTTTTCCAGTTT
21	I	(3924475..3924550)	75	TTGCTACTTGTATTACCTGCTTTTTGCAATATTGCAATATAATAGATCATAAAGCTCATTGACAGTTCTACACATC?
22	I	(3959672..3959726)	54	GAATCCCCACATTGAAAAGT GCATCACCCTTACCT TATAGGCAAAGCCAAGCAGG
23	I	(4257626..4257676)	50	GCGTTGGTGT AGTAAGGGTAAGGT CACTAAGCGCACGTTGGGTGTTATAG
24	I	(4525132..4525220)	88	CTACGTAATATTTACTAAATCCCTGCATACAACATTATAAGAAACCACTTCCGGTAGTTATCGAGAACTAACGGTAAATTGCGGTAA
25	I	(4680217..4680286)	69	ATTGTCTACTGAGAAAC CGGGAAAGGGTAATGC ACTTTTCATAATTAAATGGCTGAACAGCGTGTAGCGAG
26	I	(4690060..4690120)	60	GACTGTGTCTTTG AGGAAGGGTAAGGC CTGTTACGTACGCGCTCCTTCCAAACATGGTGG

RESULTADOS

Pico n°	Cr	Posición	Longitud del pico (pb)	Secuencia
27	I	(4762979..4763034)	55	T GCACCACCCTTCT CTTTGTAAGTGTTTAGCATAAGCATACCAATTCTTACCTT
28	I	(4806446..4806517)	71	ATTAACAAAACACTACCACCCAAAAACGA GTATCCTCTTACT GAAGATTTTTTGTAAAAAAAATACTA
29	I	(4826134..4826202)	68	GAGGGCTACTCGCATCAGTAGATACCGTCGCCCA AGTAAGGGTGGCGC ACTACTCTAAACAAGCAGA
30	I	(4897516..4897595)	79	ACGCAGTTTGGTATCTGATTTAAGGATACGTAGAACTGCGGTGAGTTTTCCTTGTGGTCTATTATATTACAATACACAG
31	I	(4954506..4954567)	61	GTATGAGAAAA GCCTCACCTTACC GTTGCGATACGACATTGTAAAAGCCAGCTTTA CTC
32	I	(5174683..5174769)	86	ATATAGGAAGTTCATAGAATTTTGCAGAACAAATCGTCTTCGAAAAATTTCTCGTTTAG GGTAAGGGTCTGT CACCTTTCCCGAA
33	I	(5574330..5574402)	72	ATAATTCTTATTAACGCACTACACAGTAGAATACGTTTCACACTATATTTTTGT GTCTCCTCT TCCTACTT
34	II	(193633..193676)	43	GCAGTTTGCTAGCACAGCGATTT AGGAAGGGTGGGAC ACAAAC
35	II	(202153..202221)	68	TCGCACTCGCTTCCACACTACAACTACGCAATAACTCATCATTTCCCCACAAAAGTGACGTATTGTCC
36	II	(228106..228168)	62	AGGAGGAAGG AGGAAGGGGAGA AGGAAGCCTTGAGTGGGACGGGTAAAGTTCGTTGTGGG
37	II	(344294..344347)	53	AGCTGAGATTACACGCTG AGTAAGGGTAATGC ACCAGCTCAATTTACGAAAAAT
38	II	(387462..387546)	84	GTTATATGCGATAACTCGCTAAATTACTTTTATACACCGCAGAGAAGCGCAATGAAAATGAGCATAAACATTCCAGTGCCTAT
39	II	(802946..803035)	89	GCTGAATAAGTTACTAAAGTTGAATACATGAATAAAGTTATCTAAGC GAGAAAGGGTGATGT AAGAAAACACTGTAAATAATGAAGTCT
40	II	(841927..842000)	73	TCCTTTTGCTACCTCTCATTTCTCAAAGAGGCAAATCATCTCGGCCGAAGCTGGATTCCAAGGAACGAGAAGGG
41	II	(1190827..1190872)	45	AGTTTACTTGGTGGATGTACGAATATAAGT AGGTAAGGGTAGGGC
42	II	(1239227..1239301)	74	TCACGCAGTAGTTATCCAGCTAGCATTGATAATGGACGAAGGTTCGAATCGTATAGGTAGAACAGTCACCTTCT
43	II	(1414372..1414454)	82	CATAAAATTTCTTAATATTATCATAACGAATTCATGGTAAAGAC GTCTTACCCTTACC TTCCGTTGGTTTATAACAGTATTC
44	II	(1744753..1744813)	60	GTAAAGTGGCGGGTGGGGTTTACAACCTGATCAGGATCTAG GGTAAGGGTAGTAC ACAAAGGT
45	II	(1952317..1952375)	58	TGTTTCCCCACGTTGGCTTGCCTTATTGCAAACGACGCAATGATGACGAGCCCTTGG
46	II	(1953059..1953128)	69	ATCAACTTGACCCTTCGCTTCTCTATTCC GTCCACCTCCCT CGCTTTTACAAACCTTCTTACTTAG
47	II	(2012317..2012403)	86	GTTTGGTATCTGATTTAAGGATACGTAGAACTGCGGTGAGTTTTCCTTGTGATCTATTATATTACAATACACAGGTTGTATGAGTA
48	II	(2113387..2113464)	77	T GTACATACCCTTCC AAGTGGGAGGTAGAGATACGTGGGGGTAAAGACTGAGGTGAGTAGGAAGGCGGTAAGGGGAA
49	II	(2129407..2129474)	67	TAATGTAAGGTTCTACTTTATCATTGAGCAGCGGTTTCGAT TTGCGACCCTTA ACTATTATGTAATA
50	II	(2136848..2136891)	43	GGGATTTATTACATAATA GTTAAGGGTCGCAA ATCGAACCGC
51	II	(2200539..2200599)	60	TGCATCACCCGAAGTGGCGACTGA GGGAAGGGTGGGGC ATCAAGTAACGCTCCTTTCTC
52	II	(2218041..2218113)	72	CGCGAAATCTAATTAATCACGAAGAGTAAATGAGATGTCGCGTTCAACTCTACGTGTCGTGTCGCGTTCTAC
53	II	(2357381..2357437)	56	GTTCTTTCAAACTAACAGCGAAAT GGGGAAGGGTAGTGC ACATTATTGAGGCCTA

RESULTADOS

Pico n°	Cr	Posición	Longitud del pico (pb)	Secuencia
54	II	(2395585..2395667)	82	GAGAAAAATCTAATAGTAATTCGAAAAATTCTCACTTCGTCAACGATGATGAAG GCACTACCCTTACC ACGTTTTTACGTACG
55	II	(2426011..2426097)	86	GATTTAAGGATACGTAGAACTGCGGTGAGTTTTCTTGTGATCTATTATATTACAATACACAGTTGTATAAGTAGCAACTGAGTA
56	II	(3322923..3322981)	58	ACCGTTGTGCTTCATTCCACCAACACATTC GGAAGGGTAGGGC ACTTGTACCAATAA
57	II	(3784514..3784575)	61	TCCATGACACTCTCTTGAAACCCCGTTC GGAAGGGTCGGAC ACATTTATTGAGTTCAATA
58	II	(3879898..3879948)	50	ATTGTAAATAGCGTAGAGGTTTAGTCCTGAAC GTCTCACCTTCTT TTG
59	II	(3980790..3980865)	75	AAAAGTGCATCCGGCAGCATTAGAGTATGTGGTATAAAGTGTACTATTTTTAAGGTTGTGCGTGGGATTTCAAGG
60	II	(4064446..4064500)	54	TTGCAAAATCGCGGTAATAC GCACTACCCTTACT TAATGGAATACACAACGGTTT
61	II	(4159494..4159558)	64	ATTTATACCCCAATTAATC GGGGAGGGTGAGGC ATTTAGAAAGTCGATGGAATGCCGTGGATCA
62	II	(4519159..4519224)	65	AATTCTTATTAACGCACTACACAGTAGAATACGTTTCACACTATATTTTTGTGTCTCCTCCTTCC
63	II	(4532702..4532781)	79	CAGAAAAAGTCAGAGTGCTTTTCATTGTAAAGTTACCATCCCCACCCACCCAACGGATGTTGATGCAAAAGTACGAG
64	II	(4538075..4538094)	19	TGAAGTTGATTGAATTGA
65	II	(4539007..4539061)	54	AAGTTTATAGAATAAGGCTGTGTTGTAATGCAGTAAGTTGAATAAAGATACGCA
66	III	(5605..5687)	82	TTCCACAAAATTGGGTATTGGGTATTGAGTATTTTCCACCAATTCCTAATACTAATACTACTACTACTAATAACCCCCCTACT
67	III	(16505..16562)	57	ATTTTCCACCAATTCTAATACTAATACTACTACTACTAATAACCCCCCTACT
68	III	(241620..241666)	46	TACCCACTACTACTGCCCT GCCTTACCCTGCCCT TTTTTCAAAAA
69	III	(346784..346869)	85	AATGCCTTGCAATTCTGCTACATTTACGTGGTAGCTTACTGTACTACATTGCACTCTACTGCACTGCTTGGCACCCCTCTTAACGTG
70	III	(352374..352438)	64	TAGGGAATGGCTGATCTCATGGAATCGGTGCGTCGCGTCGCGTCGCTGTTGCATTGCGCATAACG
71	III	(836050..836133)	83	AACAAAATACTAGGCGTAGGTAAACAATCTAATATATCAGCGTTCGAATCCGGCTGCCATCACATTTTATTTAACCCGTTTAG
72	III	(862257..862314)	57	TGTCCACATTTGGTCCAATCAGTCGCAG CCCCGTCCCTTTCT CCCATGCATTTTCGGC
73	III	(939183..939258)	75	GCCATTTGCTGCGATCTCTAGAAACTTCTTCGCACCCGAAAGCGCATCTTAAGGTTTTTCCGGCAGATCTTTTCG
74	III	(1372911..1373002)	91	GATATTTTCGACATCGTTATAATACTAAGCCTAATCATGTCTTCATAGACACCGATCGTTTCCGAGGCAACTCACAATGGATGTTTTG
75	III	(1632230..1632339)	109	CTGCGGTGAGTTTTCTTGTGGTCTATTATATTACAATACACAGGTTGTATAAGTAGCAACTGAGTATAGGTATTGTATTAACCTGGATTATAATGTTACCTATCACTAA
76	III	(2012402..2012466)	64	AACAATGCTGCGCCCATGTGCACGTGACGG TACTCTCCCTTCCCT TTGTTGATGAAGAGCCGAG
77	III	(2158731..2158797)	66	TAAAACAAGATAATGTGTAAGCTACGAAGTTTGGTATCTGATTTAAGGATACGTAGAGCTACGGTG
78	III	(2210713..2210835)	122	TTACAATACACAGGTTGTATAAGTAGCAACTGAGTATAGGTATTGTATTAACCTGGGTTATAATGTTACCTATCACTAATATAGCTCATAACTGAACTGAGGAACGAGGTTTCAGCAGTAGCTC
79	III	(2432308..2432386)	78	GTTGCTACATATAGTACCTGTGTATTGCAATATAATAGATCACAAAGGAAAACTACCGCAGTTCTACGTATCGTTAAA

RESULTADOS

Pico nº	Cr	Posición	Longitud del pico (pb)	Secuencia
80	III	(2447565..2447676)	111	TTTTGTAGTAGGGGGGTATTAGTAGTAGTAGTAGTAGTATTAGGAATTGGTGG GAAATACTCAATACCCAATACCCAATTTTGTGGAAGTAAAACTTTTGAA
81	Telómero	(10185..10279)	94	TTAAGGATACGTAGAACTGCGGTGAGTTTTCTTGTGACCTATTATATTACAATACAC AGGTTGTATAAGTAGCAACTGAGTATAGGTATTGTA
82	Mating type	(206..279)	73	TAAGGTTCTACTTTATCATTGAGCAGCGGTCGATTGCGACCCTTAACATTATGTA AATAAATCCCGGTTTCG
83	Mating type	(19854..19912)	58	CCGGGATTTATTACATAATAGTTAAGGGTCGAAATCGAACCGCTGCTCAATGATAA A

Tabla 3. Secuencias de los picos de unión de Reb1 localizados mediante el programa CLC genomics workbench. Los picos 23, 25 y 37 corresponden a las regiones de los genes *cyp8+*, *ste9+* y *kes1+* respectivamente, se trata de secuencias de unión a Reb1 descritas previamente (Rodriguez-Sanchez et al., 2011; Singh et al., 2010). Los picos se han numerado para simplificar el análisis posterior. Cr se refiere al cromosoma en el que se encuentra el pico. En rojo está destacada la secuencia del motivo de unión de Reb1 de MEME.

De los 83 picos detectados la secuencia más corta mide 19 pb y la más larga 148 pb siendo la media de 70,1 pb. Debido a la naturaleza repetitiva del rDNA se tratará la detección de los picos de esta región en una sección separada (sección 4.5.4).

Entre los 83 picos encontramos que el 1,2% caen sobre tRNAs, el 10,8 % sobre LTRs y el 88 % restante sobre otras regiones del genoma.

4.5.1.2. Reb1 se une principalmente a las regiones promotoras de los genes

Como previamente hemos descrito, Reb1 se une a una secuencia del promotor de *ste9+*, de hecho se une en la región del 5'UTR de este gen, mediante el análisis ChIP-seq hemos confirmado la localización de la región de unión de Reb1 al promotor de *ste9+* (pico 25). Como sospechamos que Reb1 puede estar actuando como regulador transcripcional de la expresión de otros genes, decidimos hacer un estudio de la localización de los picos de unión de Reb1 con respecto a los genes adyacentes (Adjuntamos archivo de hoja de cálculo en el que se ha realizado un estudio detallado de los picos). En la figura 22 A se ha estudiado la localización de los picos de Reb1-TAP con respecto a los genes localizados hasta 1500 nucleótidos aguas arriba y abajo del pico, en esta figura observamos una acumulación de picos de Reb1 en la región del sitio de inicio de la transcripción (TSS, *Transcription Start Site*) de los genes

RESULTADOS

adyacentes. Observamos una menor acumulación de picos en la zona del sitio de finalización de la transcripción (TTS, *Transcription Termination Site*).

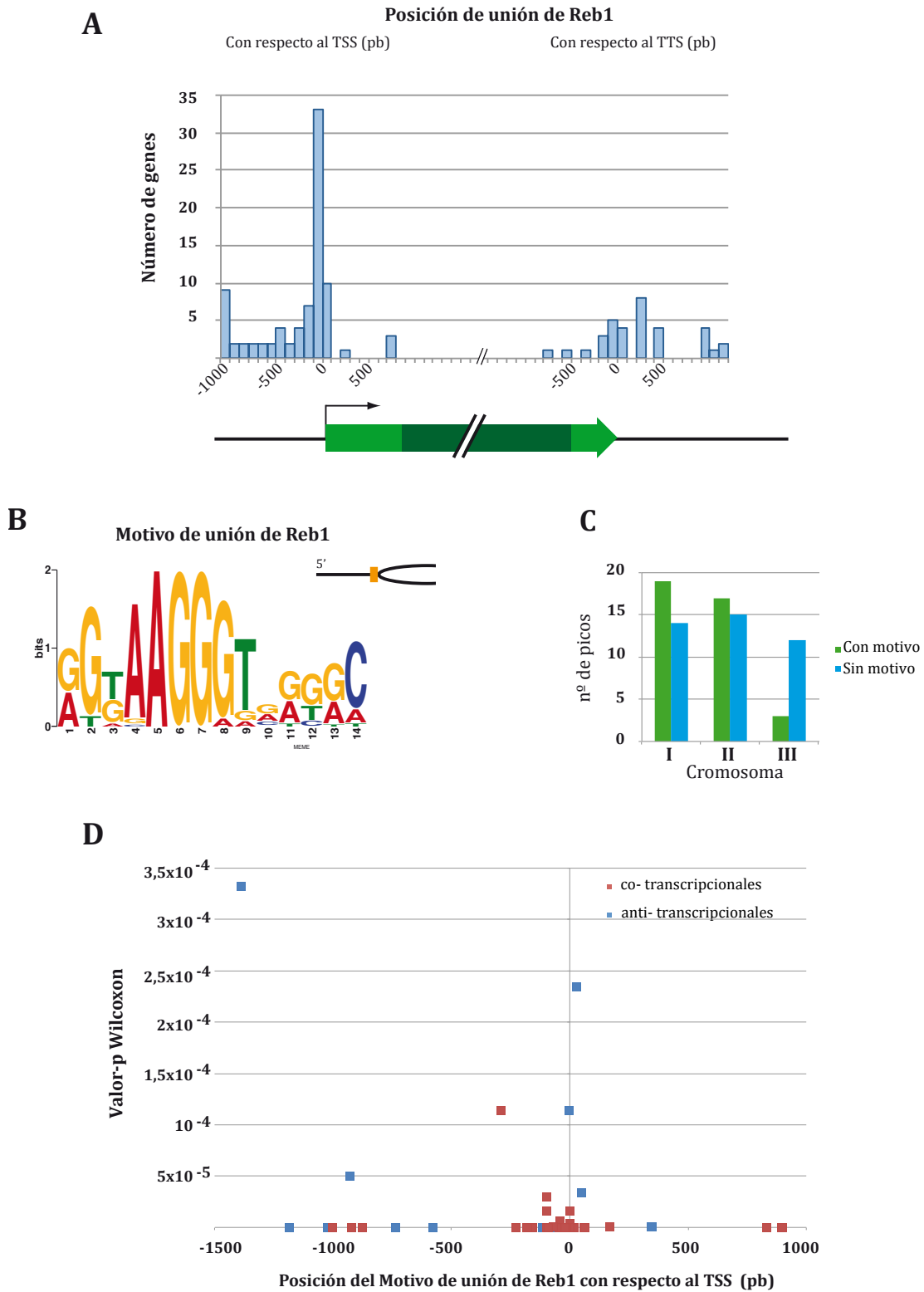


Figura 22. Reb1 se une a múltiples sitios en el genoma de *S. pombe*. A. Representación de la localización de los picos (situados a menos de 1000 pb aguas arriba y abajo de su gen más próximo) frente a un gen promedio de *S. pombe* en verde oscuro se representa la región codificante mientras que en verde claro se muestran las regiones no codificantes. B. Motivo de unión al DNA de Reb1 (rico en Gs), representación realizada con el

RESULTADOS

programa MEME, a la derecha se muestra la dirección hipotética de parada de horquillas frente al motivo. C. Disposición de picos de Reb1 en los distintos cromosomas de *S. pombe*, en verde se muestran los picos con motivo y en azul los picos sin motivo. D. Representación de la localización de los motivos MEME de unión al DNA de Reb1 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen más próximo en función de la calidad del valor del motivo (valor p). En rojo se representan los motivos que producirían una parada de horquillas co-transcripcional al gen más próximo y en azul las que pararían horquillas en sentido contrario a la transcripción. Como un mismo pico puede estar localizado entre dos genes divergentes se pueden observar dos puntos con el mismo valor p y posición diferente frente a uno u otro TSS.

4.5.1.3. Más de la mitad de los picos de unión de Reb1 presentan un motivo común de unión al DNA

Las secuencias de los 83 picos se analizaron en busca de motivos de unión de Reb1 mediante la herramienta *on-line* MEME <http://meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme.cgi> (Bailey et al., 2009). Un motivo es un patrón de secuencia que se observa de manera repetida en un grupo de secuencias de DNA. La herramienta MEME representa el motivo en forma de matriz, de tal manera que en cada posición del motivo se asigna a cada letra la probabilidad de encontrarse en esa posición en el motivo. El *output* del programa es una matriz con estas posiciones y un LOGO en el que el tamaño de las letras representa cuán probable es que la letra se encuentre en esa posición. Utilizamos los parámetros por defecto del programa pero seleccionando que la secuencia que buscamos se puede hallar cualquier número de veces dentro de cada una de las secuencias analizadas. Gracias a este programa definimos un motivo de unión de Reb1 de 14 pares de bases (con un valor p de $4,5 \times 10^{-83}$) cuyo logo viene representado en la figura 22 B. En este logo solo hemos representado la secuencia de una de las dos hebras, a la que hemos denominado rica en Gs. Se ha elegido esta secuencia rica en Gs como la que se analizará posteriormente ya que es la que se encuentra en la hebra codificante del rDNA y previamente la habíamos descrito como la secuencia de unión a Reb1 que genera las barreras para las horquillas replicativas en las RFBs del rDNA. En el caso del rDNA esta secuencia bloquea las horquillas que avanzan en sentido contrario a la transcripción del rDNA, es decir de las horquillas que avanzan desde 3' a 5' de esta secuencia (como se muestra en el esquema

RESULTADOS

adyacente al logo). En la gráfica C de la figura 22 se muestra el número de picos encontrado en cada cromosoma que contienen o no el motivo de unión de Reb1 de MEME (Para un estudio detallado de estos motivos ver hoja de cálculo del material suplementario). Teniendo localizados los motivos MEME de unión de Reb1 nos centramos en analizar la orientación del motivo de unión de Reb1 rico en Gs con respecto a la situación del sitio de inicio de la transcripción (o TSS de *Transcription Start Site*) de los genes adyacentes. En la figura 22 D se observa una representación gráfica de los picos con motivo de unión de Reb1 en los que se muestra el valor p del pico (filtro Wilcoxon que aplica el programa CLC para la detección de picos, cuanto menor es el valor p más fiable es el pico), en esta gráfica los colores muestran que horquillas pararía la unión de Reb1 al motivo con respecto del gen en estudio. Hay que mencionar que un mismo pico puede tener 2 o más genes próximos por lo que en el eje de ordenadas podemos encontrar dos puntos con un mismo valor p que se encuentran a distinta distancia del TSS (ya que el pico se localiza entre dos genes). Mediante esta representación comprobamos que la mayoría de los picos con mejor calidad se encuentran entorno al TSS y que estos picos contienen motivos de unión de Reb1 que indican que pararían horquillas que avanzan en el mismo sentido de la transcripción (co-transcripcionales, como sucede en el caso de *ste9+*), es decir que su secuencia rica en Gs se encuentra en la hebra no codificante. En la figura 23 se puede observar una representación de la localización de los picos de Reb1-TAP y de los motivos FIMO en algunos de los genes que posteriormente se han estudiado en más profundidad.

RESULTADOS

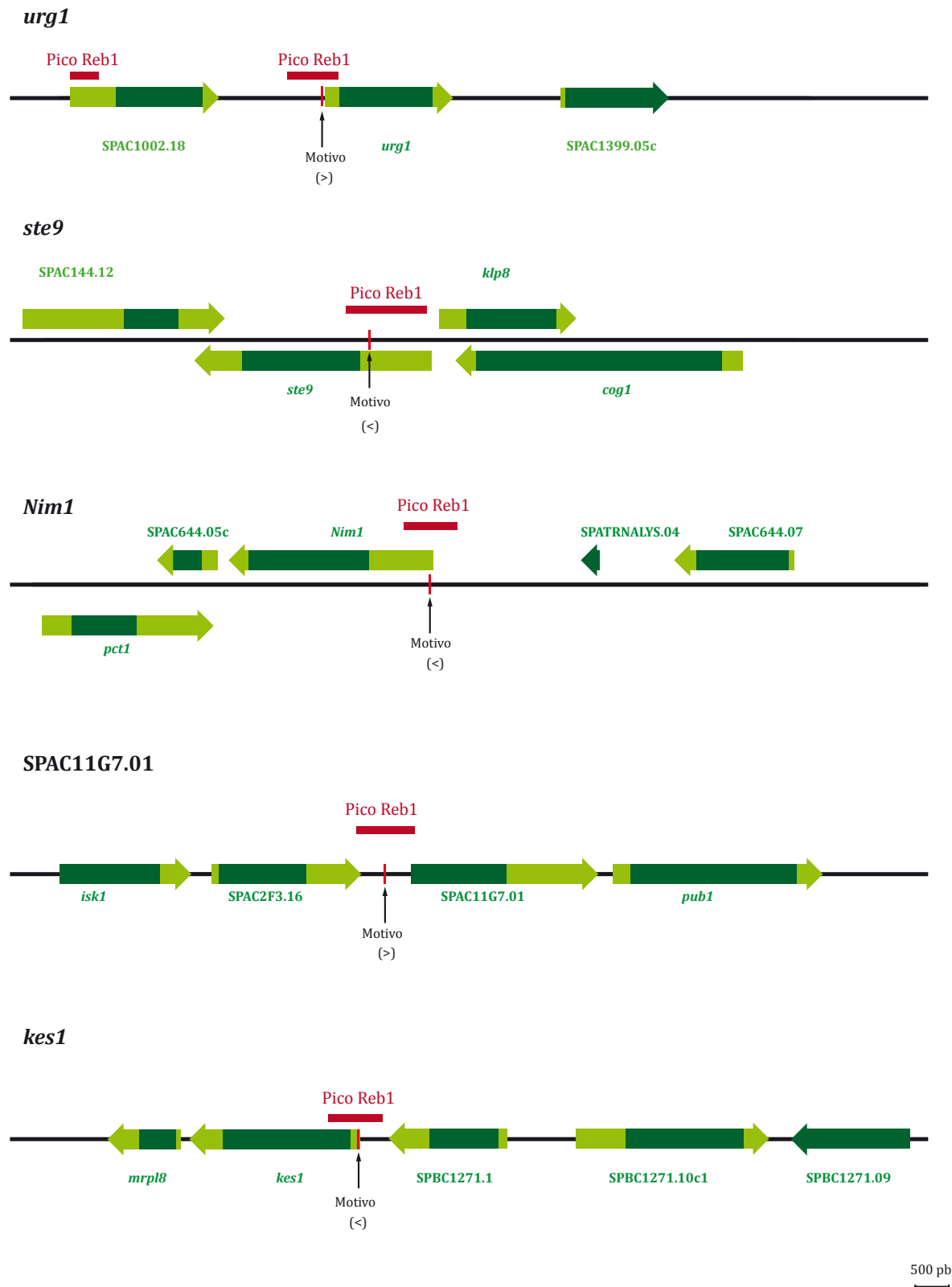


Figura 23. Reb1 se une preferentemente en la región promotora de los genes y se coloca de manera que pararía horquillas replicativas que avanzan en sentido co-transcripcional. Representación a escala de algunos de los picos de unión de Reb1-TAP en MM, en color rojo se denotan los picos. En verde oscuro se representan las regiones codificantes y en verde claro las regiones no transcritas 5' y 3'. Las flechas señalan una raya roja que es donde se localiza el motivo FIMO, entre paréntesis se representa la localización del motivo rico en Gs, (>) indica que se encuentra en la hebra 5'→3' y (<) en la hebra complementaria.

RESULTADOS

4.5.2. Reb1 podría estar regulando genes involucrados varios procesos biológicos

Realizamos también un análisis para ver si los posibles genes regulados por Reb1 guardan una relación funcional (Ver tabla del material suplementario en el que se muestra una anotación más completa de los genes adyacentes a los picos). Inicialmente realizamos un estudio de términos GO (de Ontología Génica) mediante el programa GENECODIS <http://genecodis.cnb.csic.es/> (Carmona-Saez et al., 2007; Nogales-Cadenas et al., 2009; Tabas-Madrid et al., 2012). La ontología génica es un proyecto internacional que consiste en la generación de un vocabulario controlado (denominado ontología) que se utiliza para describir a los productos génicos asociándolos a 3 categorías: (1) el proceso biológico en el que el gen está implicado, (2) la función molecular del gen y (3) la localización sub-celular del producto génico. La anotación ontológica permite hacer búsquedas en grupos grandes de genes para ver si guardan algún tipo de relación. Introduciendo en GENECODIS los identificadores de los genes en los que observamos un pico de Reb1 próximo al TSS obtuvimos varios tipos de relaciones (Ver Tabla 4).

En primer lugar observamos 8 genes pertenecientes al grupo de las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, entre las que cabe destacar la ruta de las pentosas fosfato, metabolismo de azúcares y metabolismo de metano. Por otro lado 6 genes pertenecientes a la categoría ciclo celular presentan un pico de Reb1 en su extremo 5'. También cabe destacar la presencia de picos de Reb1 en genes implicados en la degradación proteica mediada por ubiquitina.

Categorías	Genes
1. Biosíntesis de metabolitos secundarios	<i>fbp1</i> SPCC794.01c SPBC660.16 <i>tpi1</i> <i>mpg1</i> <i>eno101</i> <i>pgk1</i> <i>gpm1</i>
Ruta de las pentosas fosfato	<i>fbp1</i> SPCC794.01c SPBC660.16
Ruta de las pentosas fosfato, metabolismo del glutatión	SPCC794.01c SPBC660.16
Metabolismo de fructosa y manosa	<i>fbp1</i> <i>tpi1</i> <i>mpg1</i>

RESULTADOS

Categorías	Genes	
Metabolismo de fructosa y manosa. Glicolisis / Gluconeogénesis	<i>fbp1</i> <i>tpi1</i>	
Glicolisis / Gluconeogénesis	<i>fbp1</i> <i>tpi1</i> <i>eno101</i>	<i>pgk1</i> <i>gpm1</i>
Glicolisis / Gluconeogénesis. Metabolismo de metano	<i>fbp1</i> <i>eno101</i> <i>gpm1</i>	
2. Ciclo celular de levaduras	<i>ste9</i> <i>rbx1</i> <i>cdc18</i>	<i>cig2</i> <i>mis4</i> <i>psc3</i>
Ciclo celular de levaduras. Proteólisis mediada por ubiquitina	<i>ste9</i> <i>rbx1</i>	
3. Proteólisis mediada por ubiquitina	<i>ste9</i> <i>rbx1</i> <i>cyp8</i>	
4. Metabolismo de Glutación	SPCC794.01c SPBC660.16 <i>pgr1</i>	
5. Metabolismo de Fructosa y manosa	<i>fbp1</i> <i>tpi1</i> <i>mpg1</i>	SPAC144.17c
6. Metabolismo de inositol fosfato	<i>tpi1</i> <i>plc1</i>	

Tabla 4. Relaciones de GO de los genes. En el análisis se introdujeron 87 identificadores de genes en los que se observa un pico Reb1 próximo a la región del TSS, se estableció en 2 el valor mínimo de genes asociados .

Asimismo procedimos a realizar el mismo análisis con los genes que presentan un pico de Reb1 en su extremo 3'. En este caso el programa solo nos encontró asociación entre 2 de los genes *mcm6* y *mcm2* que los clasifica como pertenecientes a la categoría de meiosis, ciclo celular de levaduras y replicación de DNA (Para un análisis más detallado del estudio de las funciones de los genes con pico en 3' ver la tabla del material suplementario).

4.5.3. En el genoma de *S. pombe* existen otros posibles sitios de unión de Reb1

Posteriormente realizamos un análisis FIMO (*Find Individual Motif Occurences*) <http://meme.sdsc.edu/meme/FIMO-intro.html> (Grant et al., 2011) Esta herramienta nos permite buscar motivos MEME en bases de datos. De tal manera que podemos localizar otras posibles secuencias de DNA en el genoma de *S. pombe* que son susceptibles a ser sitios de unión a Reb1, y que en las condiciones en las que se ha realizado el experimento hemos sido incapaces

RESULTADOS

de detectar. El uso de estas herramientas nos permite afinar la búsqueda de otros posibles sitios de unión de Reb1. El estudio FIMO nos localizó 2195 posibles motivos de unión de Reb1 distribuidos por los 3 cromosomas de *S. pombe* (Tabla 5)

Cromosoma/ región	Número de motivos FIMO	valor $p \leq 10^{-5}$
I	963	101
II	805	88
III	421	55
Mitocondrial	1	0
Telómeros	1	0
Mating type	4	0
TOTAL	2195	244

Tabla 5. Distribución de los motivos FIMO en los cromosomas de *S. pombe*. La localización de los motivos se hizo empleando la secuencia de la base de datos del programa de *S. pombe* y usando como umbral un valor p de 10^{-4} .

4.5.4. Estudio de la región del rDNA de *S. pombe*

Debido a la naturaleza repetitiva del rDNA, como ya hemos mencionado previamente consta de unas 150 copias repartidas en dos *loci* en ambos extremos del cromosoma III, el análisis de los picos en esta zona es más complicado.

Para empezar la secuencia del cromosoma III de la base de datos solo contiene dos copias de rDNA en cada extremo, por lo que al hacer el análisis de alineamiento de secuencias la cobertura (o profundidad de secuenciación) de esta región es más de 10 veces superior a la del resto del genoma. Por otro lado, como las secuencias son idénticas la mayoría de lo que se alinea en esta región aparece como secuencias que pueden alinear en otras zonas del genoma. Si se hace un análisis exclusivamente de cobertura observamos ya un patrón diferencial entre la muestra control (wt) y la muestra problema. En la figura 24 se pueden observar los picos

RESULTADOS

correspondientes a las dos RFBs (2 y 3) y un pico nuevo que no conocíamos localizado próximo al origen de replicación *ars3001*.

Uno de los problemas para la detección de los picos en las RFBs se debe a la proximidad de ambos picos y el método que emplean los programas bioinformáticos para el cálculo de los picos. Generalmente lo que hacen es un modelado de los picos, localizan la zona de depresión entre dos picos de lo que serían las secuencias *forward* y las secuencias *reverse* del pico, y a esta zona de depresión de secuencias la denominan la cumbre del pico, puesto que las dos RFBs se localizan muy próximas hemos logrado cambiando parámetros del programa que nos detecte como pico la región que se encuentra entre las 2 RFBs, por eso no encontramos la secuencia de las RFBs entre los picos descritos en la tabla 3. Por esta razón los dos picos que se observan en el la figura 24 A de cobertura coinciden con las secuencias de unión de las RFBs que además han sido detectadas como motivos FIMO.

4.5.5. La unión de Reb1 a alguno de estos promotores actúa como barrera para la replicación

El abordaje que decidimos seguir era el de ver si la unión de Reb1 a estos otros sitios en el genoma también podría producir parada para las horquillas replicativas.

4.5.5.1. La unión de Reb1 al *ars3001* bloquea las horquillas replicativas

Comenzamos el abordaje con la secuencia más sencilla de analizar, la del *ars3001* ya que se encuentra en la región del rDNA por lo que cada célula presenta unas 120 copias de esta región. Como se observa en la figura 24 B, el *ars3001* presenta dos motivos FIMO, cuando analizamos los intermediarios de replicación de esta zona observamos que se produce una parada de las horquillas replicativas que vienen de un origen situado en otra copia de rDNA y que esta parada es dependiente de la presencia de Reb1.

RESULTADOS

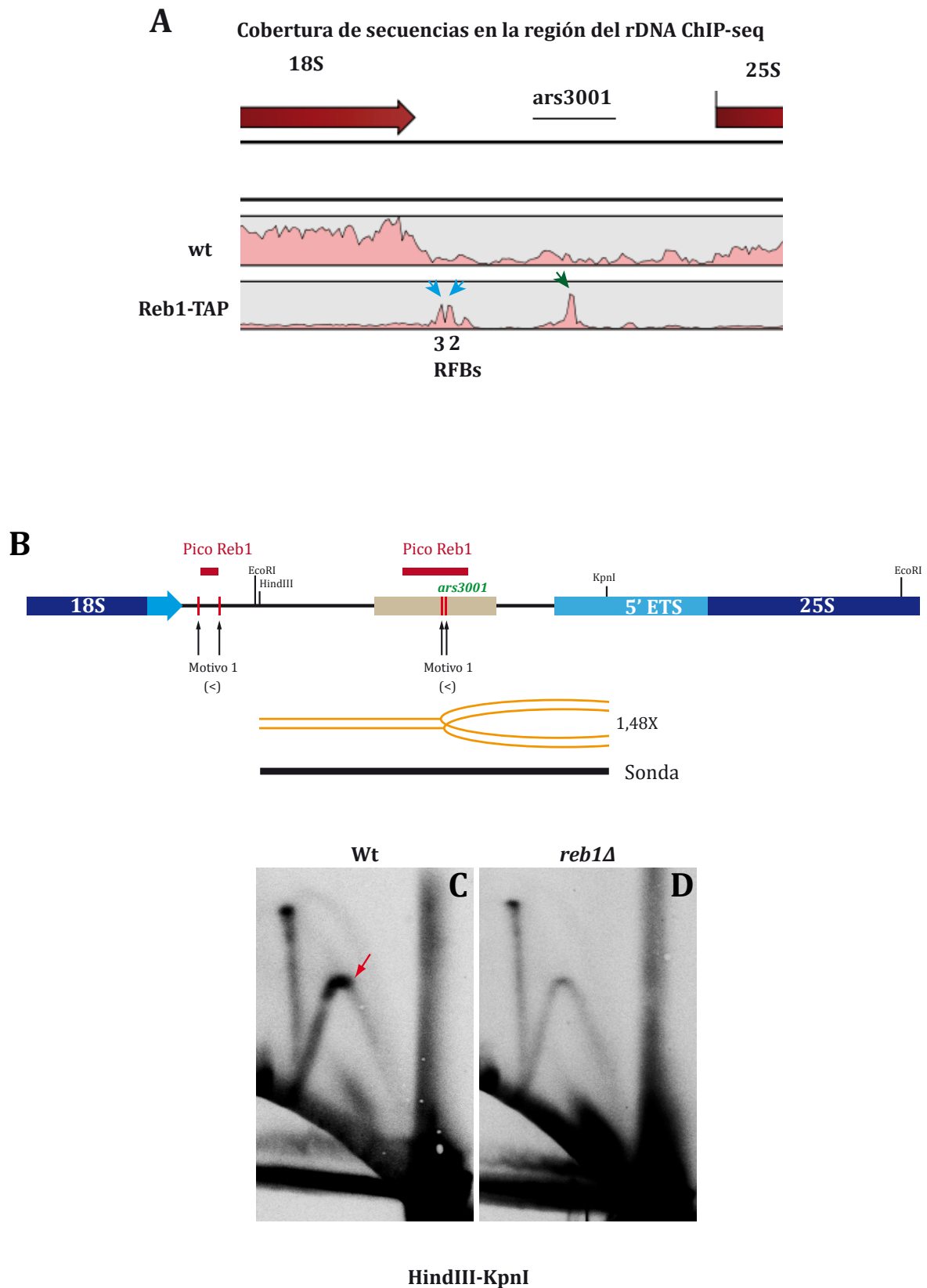


Figura 24. Reb1 se une en el rDNA a tres regiones, a las RFBs 2 y 3 y a una zona del *ars3001* y genera barreras para las horquillas replicativas. A. Representación de las coberturas de las lecturas del ChIP-seq en la región del rDNA. En la figura se muestra un detalle de una captura de pantalla del programa CLC Genomics Workbench en el que se muestra el apilamiento de secuencias que alinean en una copia del rDNA del genoma modelo tanto lo que se observa en la estirpe wt arriba, como en la estirpe Reb1-TAP. Nótese que en la estirpe wt

RESULTADOS

hay una acumulación de lecturas en la región codificante, en realidad la diferencia de lecturas con respecto del Reb1-TAP es una cuestión de escala, en el Reb1-TAP hay tal acumulación de lecturas en tres puntos concretos que el fondo casi no se aprecia. Las flechas azules denotan la acumulación de lecturas en las RFBs 2 y 3 y la flecha verde la acumulación en una zona del origen de replicación *ars3001*. **B.** Esquema representativo de la región intergénica del rDNA donde se localizan las regiones de unión de la proteína Reb1. Las líneas rojas gruesas horizontales muestran la localización de los picos detectados por el programa CLC, mientras que las flechas señalan la localización del Motivo1 (de unión de Reb1). En la región de las RBFs debido a la naturaleza de la detección de picos bioinformática, el pico queda localizado entre los dos motivos de unión de Reb1. Debajo de cada motivo se muestra la dirección de parada de horquillas representada como (<), esto significa que se bloquearían las horquillas que vienen de derecha a izquierda, es decir, las horquillas que avanzan en sentido contrario a la transcripción de los genes de rDNA. Se representa también el corte con las enzimas HindIII- KpnI necesario para el estudio de la replicación de la región del origen *ars3001*. **C, D.** Estudio de los intermediarios de replicación de la región del *ars3001* en las estirpes wt (C) y en la estirpe *reb1Δ* (D). La flecha roja muestra la acumulación de intermediarios de replicación en la zona de unión de Reb1. Estos intermediarios pertenecen a células en crecimiento exponencial en YES.

4.5.5.2. Reb1 parece actuar en el bloqueo de horquillas replicativas en los promotores de kes1+, urg1+, nim1+y de SPAC11G7.01

Quisimos saber si la unión de Reb1 a los promotores de otros genes genera barreras para las horquillas replicativas. Esta es una tarea difícil puesto que obtener buenos geles bidimensionales de genes de copia única es complicado. A pesar de ello logramos visualizar correctamente las horquillas replicativas de los genes *kes1+*, *urg1+*, *nim1+y* SPAC11G7.01 en la estirpe wt como se puede apreciar en la figura 25. En el caso de la estirpe delecionada para *reb1* no se observa en ninguno de los casos estas barreras por lo que podemos concluir, que la unión de Reb1 a estos promotores es necesaria para la aparición de barreras para las horquillas replicativas que avanzan en el mismo sentido que la transcripción.

En el promotor del gen *kes1* hay un pico de Reb1 que contiene 3 motivos de unión para Reb1, siendo el motivo central el que tiene un valor p mejor y coincide con la cima del pico. Este motivo bloquearía las horquillas que avanzan en sentido a favor de la transcripción (1), el motivo situado inmediatamente aguas arriba de este motivo central bloquearía también horquillas que avanzan en sentido co- transcripcional. Estos bloqueos podrían explicar la seña

RESULTADOS

de formas replicativas acumuladas en el wt marcadas con una flecha roja y un número 1. El tercer motivo situado en la zona codificante del gen pararía horquillas replicativas que avansasen en sentido opuesto a la transcripción (2), esto explicaría la señal de intermediarios acumulados denotada por la flecha roja y el número 2. A pesar de la pobreza del gel de la estirpe *reb1Δ* si hubiese intermediarios acumulados en estos dos puntos deberíamos de ser capaces de verlos porque en este gel observamos una señal de intermediarios acumulados marcada por una flecha verde y una interrogación (ya que desconocemos su procedencia) que se puede observar tanto en el wt como en el mutante.

En el caso del gen *urg1* la unión de Reb1 al promotor de este gen parece bloquear las horquillas replicativas que avanzan en sentido co-transcripcional. Se observa también una acumulación de intermediarios en la zona descendente del arco, en el mutante no somos capaces de observar la acumulación de intermediarios correspondiente al bloqueo de las horquillas replicativas en la zona del promotor.

Asimismo observamos un fenómeno similar en el gen SPAC11G7.01 donde en el wt observamos una acumulación de horquillas detenidas que parece ser dependiente de la presencia de la proteína Reb1.

Como hablaremos más adelante Reb1 se une al promotor de *nim1+* y regula su expresión durante el ayuno de nitrógeno. La unión de Reb1 al promotor de este gen produce un bloqueo para las horquillas replicativas de avance co-transcripcional, como se observa en la figura 25 D, la unión de Reb1 al promotor de este gen bloquea las horquillas que avanzan en el sentido de la replicación.

RESULTADOS

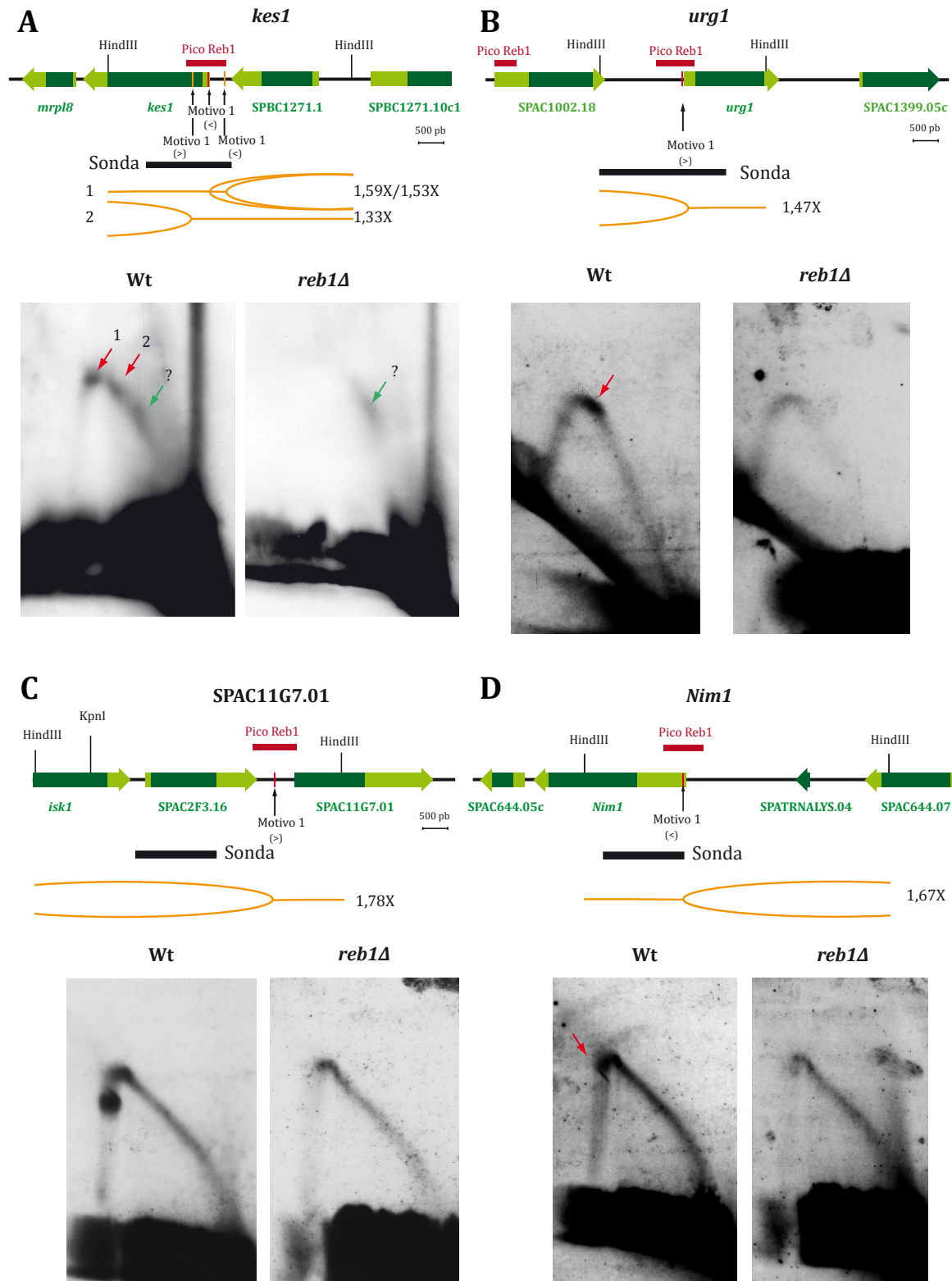


Figura 25. En presencia de Reb1 se observan horquillas replicativas bloqueadas en los promotores de los genes *urg1+*, *kes1+*, *SPAC11G7.01* y *nim1+*. Se extrajeron intermediarios de replicación (RIs) de células en crecimiento exponencial crecidas a 30°C en YES. Se digirieron con HindIII- KpnI y se hicieron los geles bidimensionales. Se hibridaron con sondas generadas por PCR para la observación de los RIs de (A) *kes1* sonda realizada con los oligos MR81 y MR92 (B) *urg1* sonda realizada con los oligos MR60 y MR90. Se realizó una digestión con HindIII para el análisis de los RIs de (C) *SPAC11G7.01* sonda realizada con los oligos MR73 y MR74,

RESULTADOS

y para (D) *nim1* cuya sonda se realizó con los oligos MR35 y MR36. Las sondas se marcaron durante la PCR con el kit de marcaje con digoxigenina de Roche (PCR DIG Probe Synthesis Kit) y se siguieron las condiciones especificadas en el folleto para su hibridación y detección. En las representaciones esquemáticas se marca con una línea roja gruesa horizontal la región del pico de unión de Reb1-TAP, y una flecha señala la localización del motivo (Motivo de unión de Reb1 de MEME) de unión al DNA. Los símbolos >< muestran la dirección del posible bloqueo de horquillas mediado por Reb1, (>) señala parada de horquillas que avanzan de izquierda a derecha mientras que (<) señala parada de horquillas que avanzan en sentido contrario. Las flechas rojas indican las posibles barreras para horquillas replicativas dependientes de Reb1. Las flechas verdes con una interrogación señalan acumulación de horquillas de origen desconocido, esta acumulación es independiente de la presencia de Reb1 ya que también se observan en los geles de células *reb1Δ*.

4.5.6. Estudio de la expresión génica durante el ayuno de nitrógeno en una estirpe *reb1Δ* mediante microarrays de expresión

Gracias a los ensayos de ChIP-seq fuimos capaces de localizar otros posibles sitios de unión de Reb1 en el genoma de *S. pombe*. La unión de Reb1 a estos sitios podría tener efectos sobre la expresión de los genes adyacentes, de hecho como ya hemos comentado anteriormente Reb1 parece unirse de manera preferente a la región promotora de los genes y en una orientación concreta (mayoritariamente el motivo rico en Gs se encuentra en la hebra no codificante, tal y como sucede en el promotor de *ste9+*).

Decidimos abordar esta pregunta mediante ensayos de expresión génica usando microarrays de expresión. Para ello crecimos dos estirpes de *S. pombe* una control y una *reb1Δ* hasta fase exponencial en MM, y realizamos un ayuno de nitrógeno. Tomamos células a los 0, 30 y 60 minutos de ayuno. Extrajimos el RNA y realizamos el protocolo para la conversión en cDNA y posterior hibridación sobre los microarrays de expresión. (Ver materiales y métodos)

Una vez obtenidos los valores de las intensidades relativas procedimos al estudio de la variación en la expresión relativa de los genes mediante el programa GENESPRING X de Agilent, usamos como normalizador Lowess. Realizamos un análisis comparativo de la expresión de los genes con respecto al tiempo 0 del control wt y representamos los valores de expresión relativa como el logaritmo en base 2 de la diferencia de expresión entre el punto de estudio y el tiempo 0 del wt. Esta transformación logarítmica del valor hace que 0 represente

RESULTADOS

que no hay variación entre la expresión de esa estirpe en el momento de estudio y el tiempo 0 del wt, un valor de uno significa que hay dos veces más expresión en el problema que en tiempo 0 del control y -1 que hay la mitad de expresión en el problema (ver tabla de material suplementario para más información).

4.5.6.1. *Reb1 regula la expresión de varios genes durante el ayuno de nitrógeno*

Del total de genes que presentan un pico en el extremo 5', la expresión de 19 de ellos parece estar regulada al menos en parte de manera dependiente de Reb1.

En la tabla 6 se han clasificado los genes en función de la dependencia de Reb1. En las figuras 26-28 de resultados se ha representado la expresión de estos genes, vista en los *microarrays*, y la expresión de los genes en una estirpe wt durante un experimento similar pero de mayor duración realizado por el grupo del Dr Bähler (Mata and Bahler, 2006), obtenidos del Gene Expression Viewer <http://www.bahlerlab.info/cgi-bin/SPGE/geexview>. En estas figuras podemos observar como en casi todos los casos los resultados obtenidos para la estirpe wt son muy similares al los obtenidos por el grupo del Dr Bähler.

Expresión basal dependiente de Reb1		Expresión durante el ayuno dependiente de Reb1		Comportamiento mixto
Sobreexpresión	Represión	Sobreexpresión	Represión	
<i>cox24</i>	SPAC212.06C	<i>nim1</i>	<i>but2</i>	<i>ste11</i>
<i>fkbp39</i>	SPAC15F9.01c	<i>ste9</i>		
<i>pgk1</i>	<i>lsm6</i>	<i>cdc18</i>		
SPAC11G7.01	SPCC63.03	<i>cyp8</i>		
<i>vrg4</i>		<i>cig2</i>		
SPBC36B7.08C		<i>cdt2</i>		
		<i>klp8</i>		

Tabla 6. Genes con pico de Reb1 en 5' cuya expresión durante el ayuno de nitrógeno parece dependiente de Reb1.

Podríamos considerar 2 grupos de genes que responden de manera diferencial al ayuno de nitrógeno en ausencia de Reb1. Tenemos un primer grupo de genes en los que la expresión a

RESULTADOS

tiempo 0 (la que hemos denominado basal) ya es diferente en los mutantes *reb1Δ*, grupo al que hemos denominado de expresión basal dependiente de Reb1. Dentro de este primer grupo encontramos dos clases de genes, (1) aquellos en los que en ausencia de Reb1 hay una mayor expresión del gen (ver Figura 26), es decir que Reb1 actuaría como represor de la expresión del gen en condiciones de crecimiento exponencial en MM (grupo al que pertenecen los genes: SPAC212.06c, SPAC15F9.01c, *lsm6* y SPCC63.03), y (2) aquellos en los que sucede todo lo contrario (ver Figura 27), en ausencia de Reb1 la expresión basal del gen se ve reducida, en este caso Reb1 actuaría de promotor de la expresión de estos genes. A este segundo subgrupo pertenecen los genes *cox24*, *fkbp39*, *pgk1*, SPAC11G7.01, *vrg4* y SPBC36B7.08c.

En segundo lugar encontramos un grupo de genes cuya expresión basal es muy similar tanto en el control como en las estirpes *reb1Δ*, pero cuya expresión durante el ayuno se ve afectada por la ausencia de Reb1 (Ver Figura 28). En este grupo se encuentra *ste9*, anteriormente ya hemos mostrado que la sobreexpresión de este gen durante el ayuno de nitrógeno es dependiente de Reb1. En La figura 28 observamos la pauta que siguen otros genes que se comportan de manera similar: *nim1*, *cdc18*, *cyp8*, *cig2*, *cdt2* y *kfp8*. En todos estos genes vemos que los mutantes *reb1Δ* no son capaces de alcanzar los niveles de expresión del wt. De estos siete genes, tres pertenecen a la categoría de ciclo celular (*cig2*, *cdc18*, *ste9*) y dos a la de proteólisis mediada por ubiquitina (*ste9* y *cyp8*). Todos estos datos nos hacen pensar que Reb1 podría actuar como promotor de la expresión de genes necesarios para la entrada en G1, de hecho tanto *cdc18+* como *cig2+* son transcritos por MBF. Por esta razón nos fijamos en el patrón de expresión de 4 de los genes que se han descrito como transcritos por MBF y que son necesarios para la entrada en replicación. En la figura 29 observamos como en todos los casos durante el ayuno de nitrógeno hay un retraso en la sobreexpresión de los genes dependientes de MBF en la estirpe deficiente para *reb1*. Cabe destacar que el gen *res2+* perteneciente al complejo MBF presenta un pico Reb1-TAP en su promotor, por lo que no podemos descartar

RESULTADOS

que Reb1 esté actuando sobre la expresión de este gen MBF, regulando de este modo la acción del complejo, aunque en estas condiciones de ayuno no hemos visto que Reb1 posea un efecto regulador sobre la expresión de *res2+*.

Como ya hemos mencionado en el apartado de resultados sobre el ChIP-seq, hemos observado que Reb1 se une a la región 3' de algunos genes, por ello decidimos estudiar si podría estar actuando en la regulación de su RNA *anti-sense* (AS). Los microarrays que utilizamos para el estudio de expresión durante el ayuno de nitrógeno contienen sondas para RNAs AS además de para RNAs codificantes. En la figura 30 podemos observar los resultados de la expresión de algunos de los RNAs AS de estos genes que presentan picos de Reb1 en su extremo 3'. En este caso del estudio de los AS observamos todo tipo de comportamientos, desde AS cuya represión basal parece regulada por Reb1, es decir que presentan sobreexpresión a tiempo 0, como es el caso de los AS de los genes *rem1*, SPBCPT2R1.08c, SPBCPT2R1.06c, SPBC26H8.12, SPBC530.07c, *mcm6*; a genes cuyo AS parece estar inducido por Reb1 como es el caso de SPAC4H3.10c, *klp2* y SPAC328.03.

Expresión de mRNA dependiente Reb1	Expresión del RNA anti-sense dependiente de Reb1
<i>cdc15</i>	SPAC328.02
<i>nan1</i>	SPBC36.03c
<i>mso1</i>	SPAC2F3.16
SPBCPTR1.06c	<i>rem1</i>
SPBCT2R1.08c	SPBCPT2R1.08c
	SPBCPT2R1.06c
	SPBC26H8.12
	SPBC530.07c
	<i>mcm6</i>
	SPAC4H3.10c
	<i>klp2</i>
	SPAC328.03

RESULTADOS

Tabla 7. Genes con pico de Reb1 en 3' cuya expresión (sense o antis sense) durante el ayuno de nitrógeno parece dependiente de algún modo de Reb1.

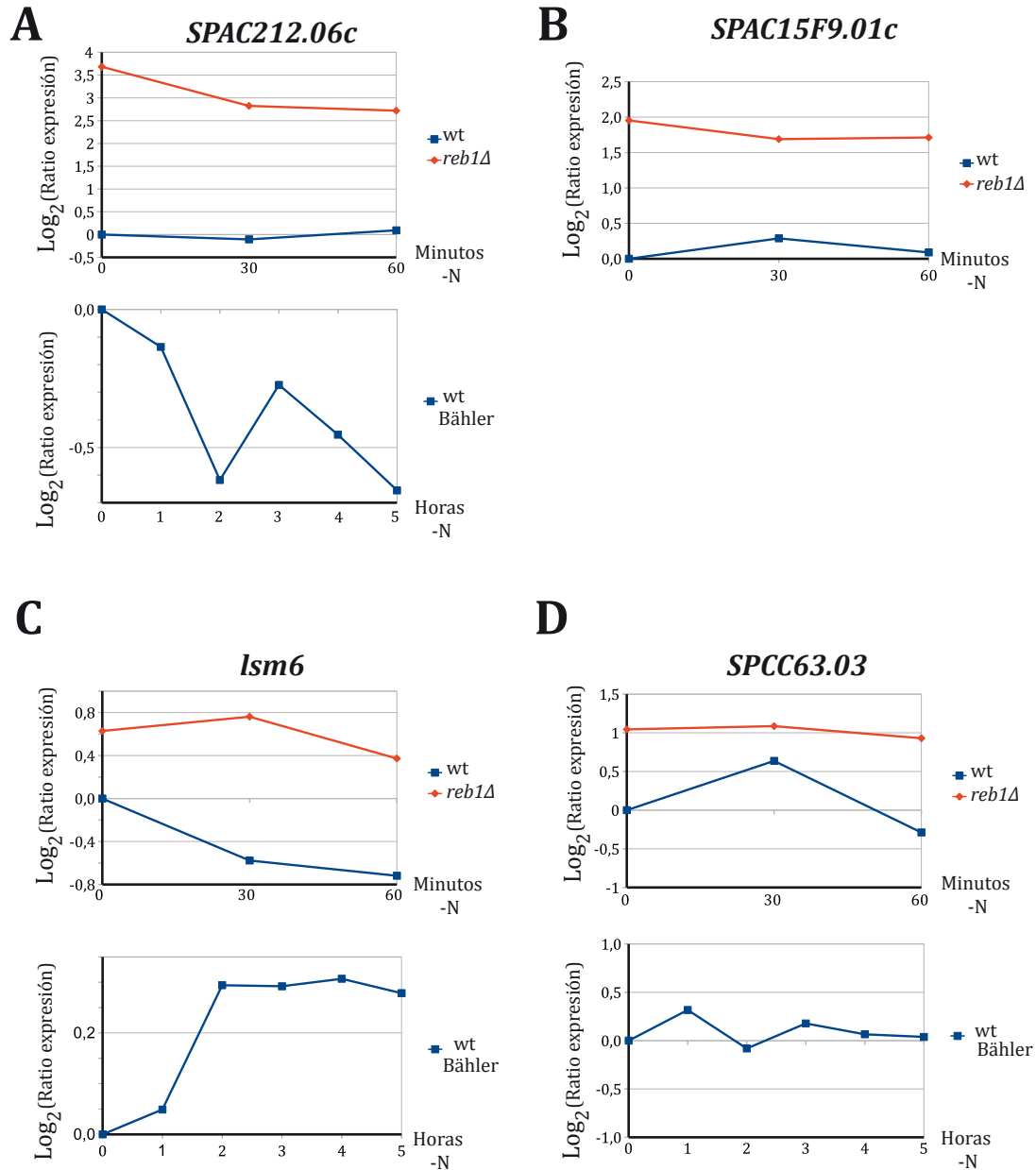


Figura 26. Genes con pico de Reb1 próximo cuya expresión basal parece regulada por Reb1 mediante represión. Representación del Log₂ del cociente de expresión de los genes indicados obtenido mediante microarrays de expresión durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. Se muestran los valores de la expresión relativa de los genes indicados estudiados a lo largo de una hora de ayuno de nitrógeno. Puesto que se representa el Log₂, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación. En los paneles inferiores de cada figura se muestra además la expresión de estos genes en un experimento similar

RESULTADOS

realizado en el laboratorio del Dr Jürg Bähler que están disponibles en la web http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/_geexview. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas.

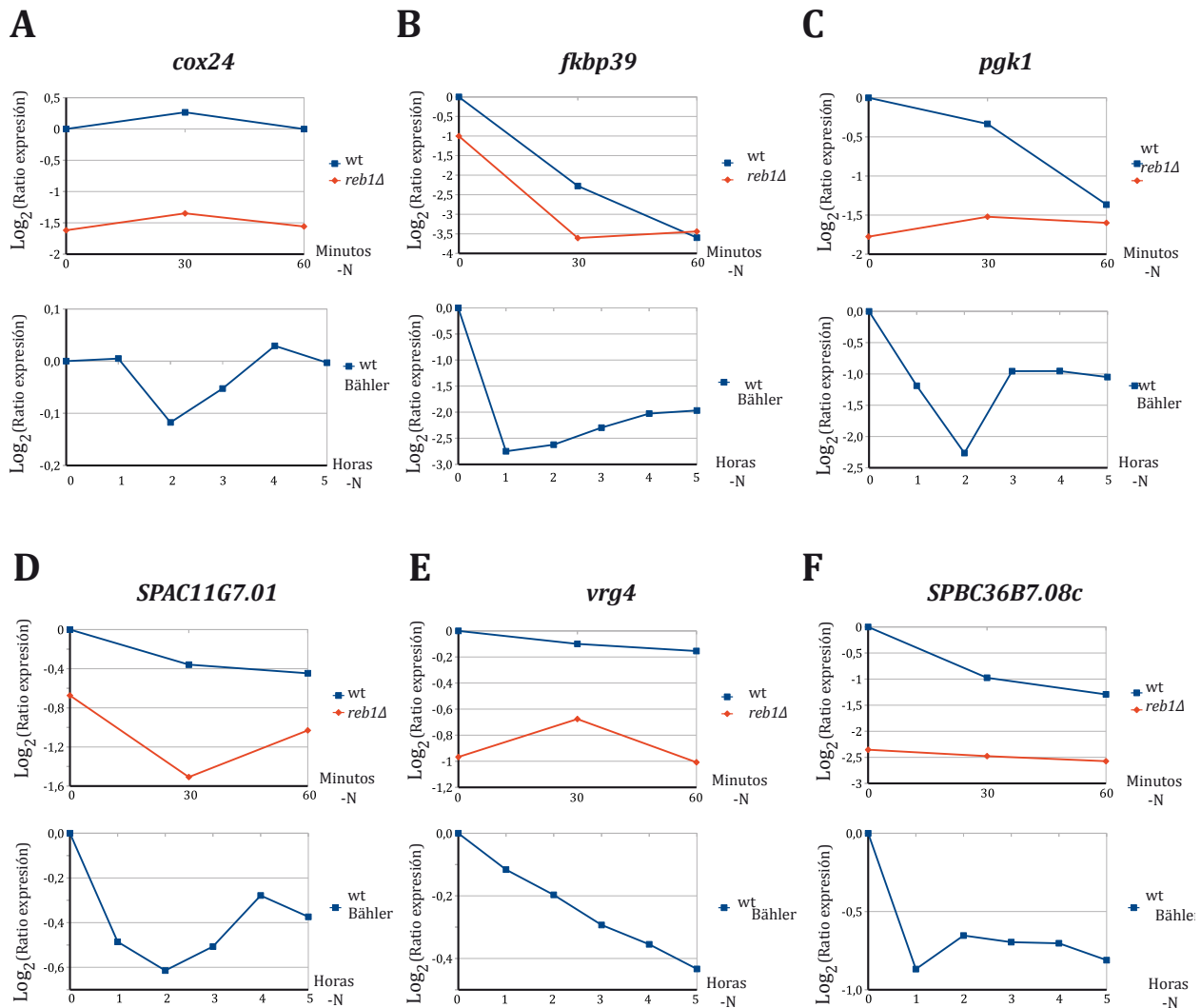


Figura 27. Genes con pico de Reb1 próximo cuya expresión basal parece regulada por Reb1 mediante inducción. Representación del Log2 del cociente de expresión de los genes indicados obtenido mediante microarrays de expresión durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. Se muestran los valores de la expresión relativa de los genes indicados estudiados a lo largo de una hora de ayuno de nitrógeno. Puesto que se representa el Log2, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación. En los paneles inferiores de cada figura se muestra además la expresión de estos genes en un experimento similar realizado en el laboratorio del Dr Jürg Bähler que están disponibles en la web http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/_geexview. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas.

RESULTADOS

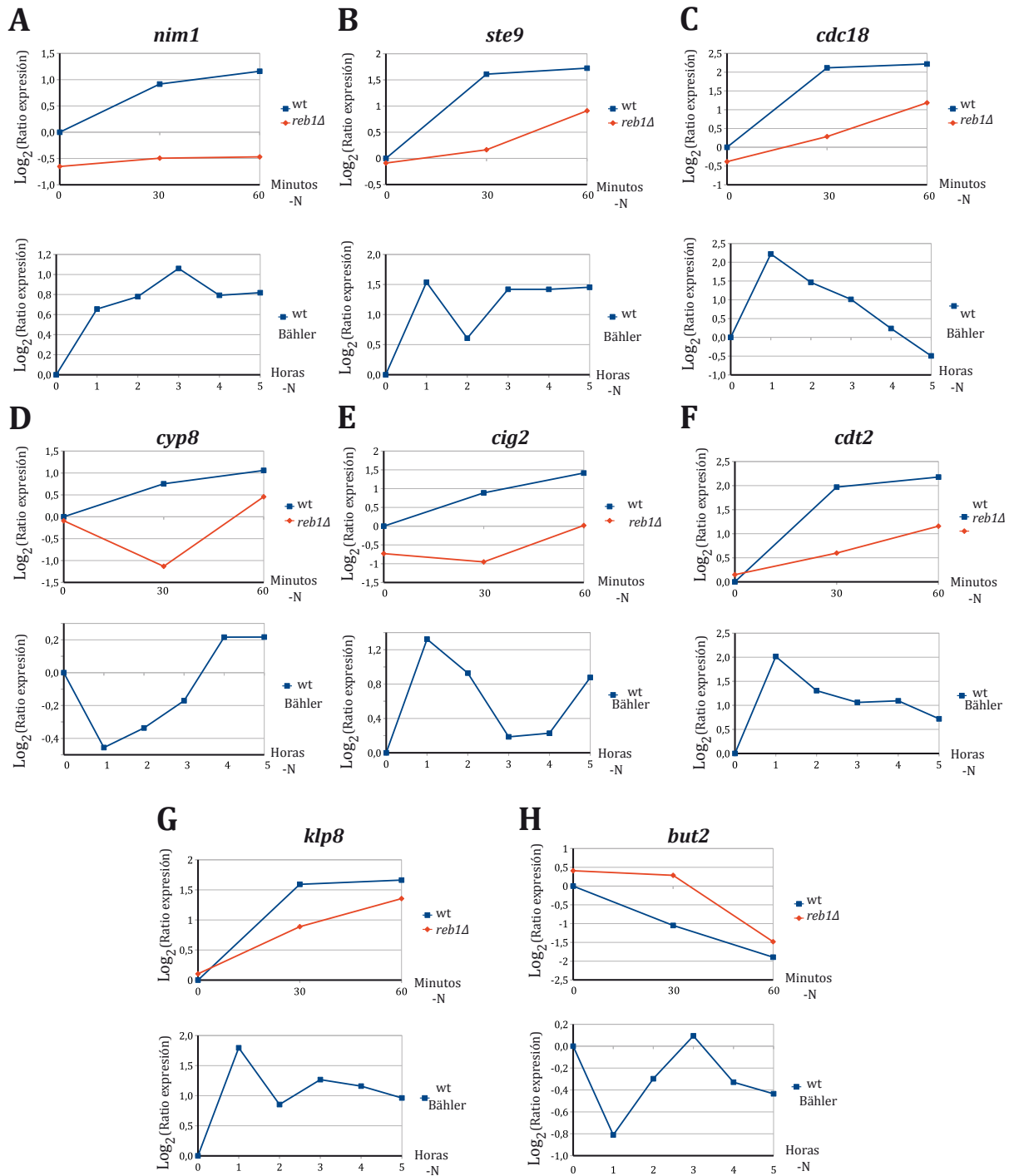


Figura 28. Genes con pico de Reb1 próximo cuyo nivel de expresión en respuesta al ayuno de nitrógeno parece regulada por Reb1. Representación del Log2 del cociente de expresión de los genes indicados obtenido mediante microarrays de expresión durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. Se muestran los valores de la expresión relativa de los genes indicados estudiados a lo largo de una hora de ayuno de nitrógeno. Puesto que se representa el Log2, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación. En los paneles inferiores de cada figura se muestra además la expresión de estos genes en un experimento similar realizado en el laboratorio del Dr Jürg Bähler que están disponibles en la web http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/_geexview. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas.

RESULTADOS

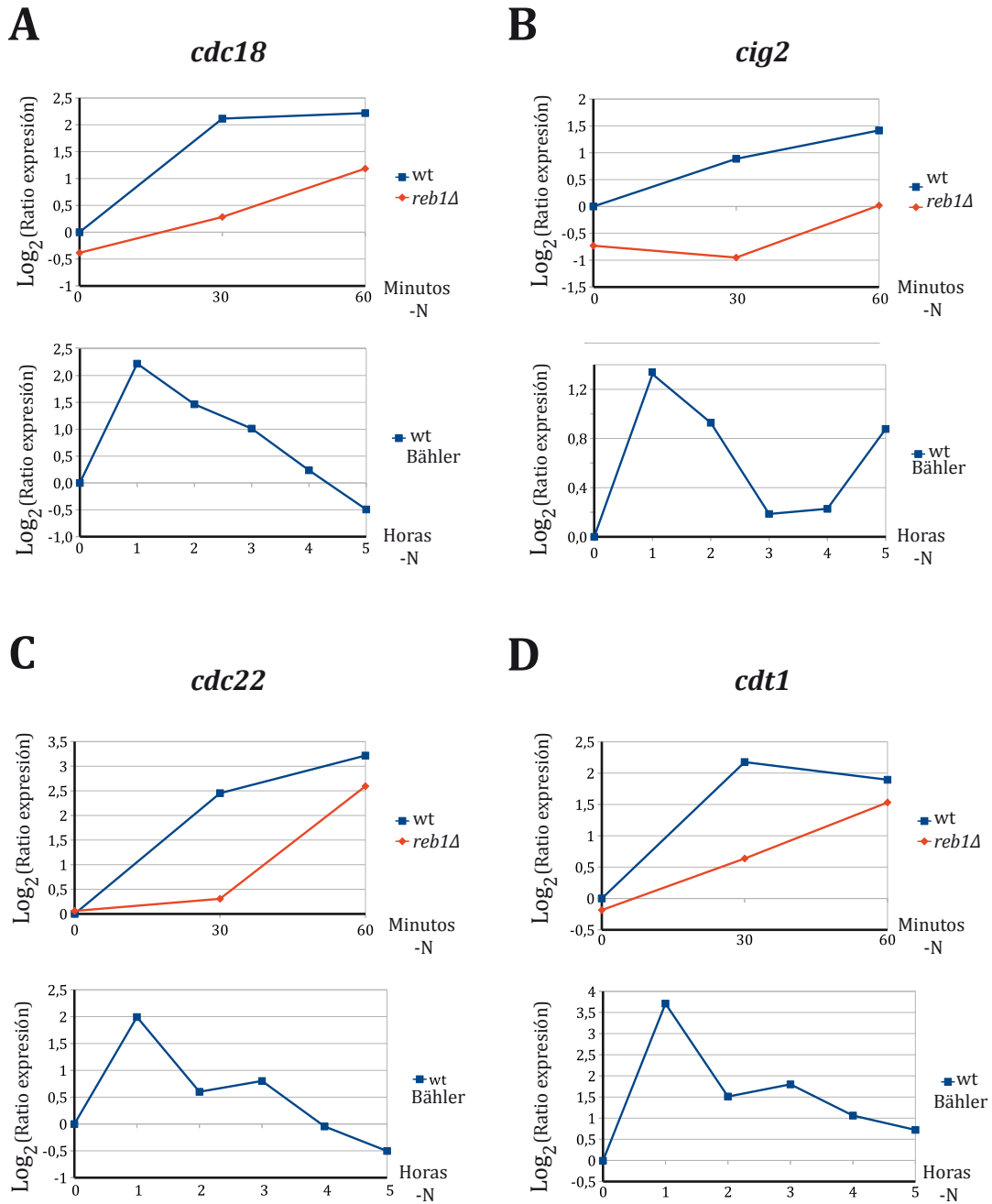


Figura 29. Durante el ayuno de nitrógeno existe un retraso en la sobreexpresión de genes transcritos por MFB en las células que carecen de Reb1. Representación del Log2 del cociente de expresión de los genes indicados obtenido mediante microarrays de expresión durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. Se muestran los valores de la expresión relativa de los genes indicados estudiados a lo largo de una hora de ayuno de nitrógeno. Puesto que se representa el Log2, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación. En los paneles inferiores de cada figura se muestra además la expresión de estos genes en un experimento similar realizado en el laboratorio del Dr Jürg Bähler que están disponibles en la web <http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/geexview>. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas.

RESULTADOS

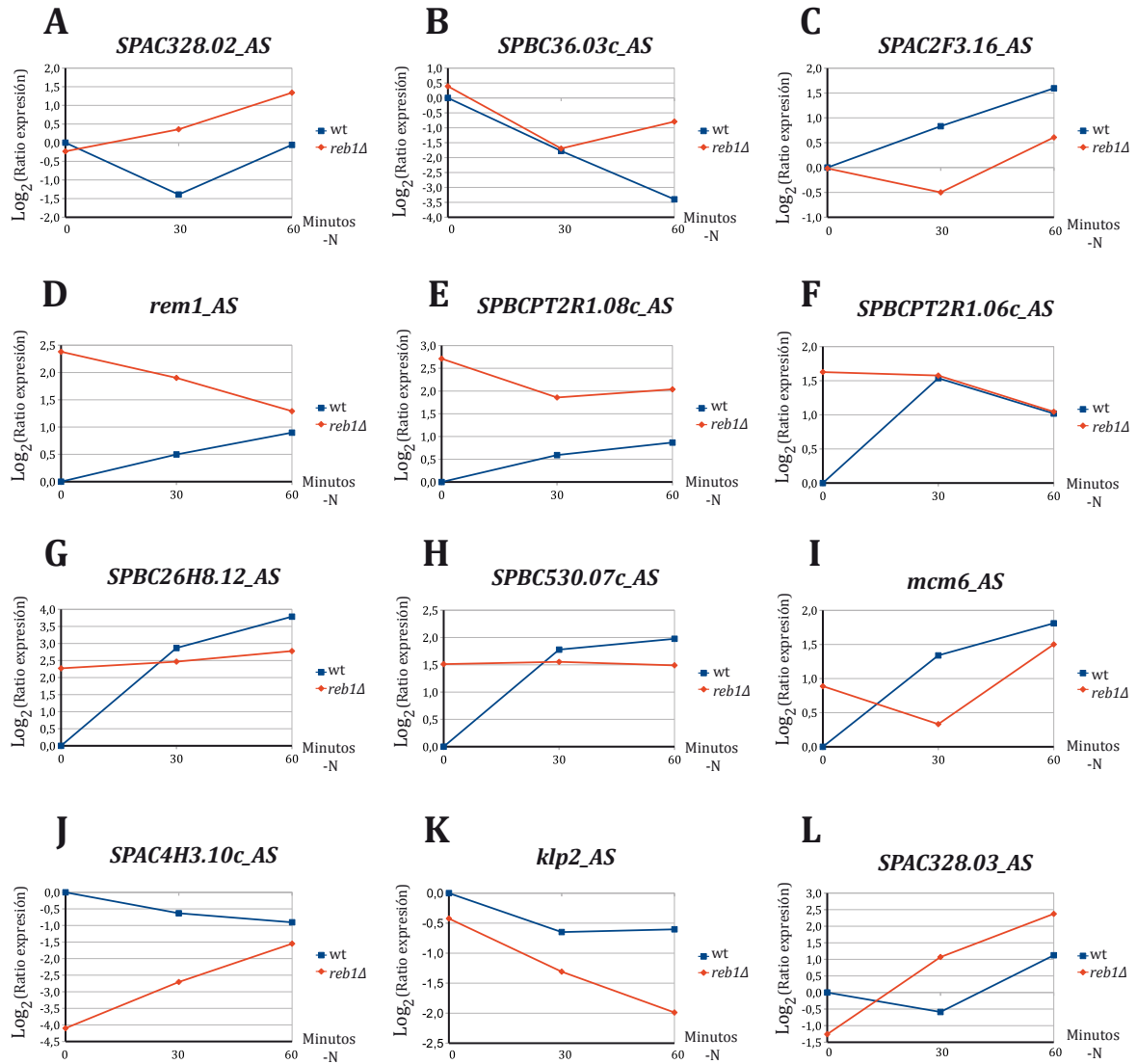


Figura 30. Regulación de mensajeros *anti-sense* en genes con pico de Reb1 localizado en el extremo 3' cuyo nivel de expresión en respuesta al ayuno de nitrógeno parece regulada por Reb1. Representación del Log_2 del cociente de expresión de los RNAs *anti-sense* (AS) de los genes indicados obtenido mediante microarrays de expresión durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*

Para confirmar los resultados obtenidos mediante los microarrays de expresión, realizamos un análisis de la expresión génica, mediante una retro-transcripción seguida de una PCR cuantitativa (RT-qPCR), de RNA de células crecidas en MM y sometidas a un ayuno de nitrógeno durante 0, 0.5, 1, 2 y 4 horas. A través de estos ensayos analizamos la dependencia de Reb1 en la respuesta al ayuno de algunos de los genes que habíamos identificado que presentaban una expresión diferencial (por microarrays) y que además presentaban un pico de Reb1 en su región promotora. En la figura 31 podemos observar en que casos la respuesta

RESULTADOS

al al ayuno de nitrógeno es dependiente de la presencia de la proteína Reb1. Entre los genes estudiados encontramos cuatro patrones:

(1) En ausencia de Reb1 las células responden de manera contraria al wt. Este es el caso del gen *nim1*, en el que vemos como en la estirpe wt los niveles de expresión de este gen suben durante las primeras horas de ayuno para descender hasta niveles basales tras 4 horas de ayuno, sin embargo en la estirpe *reb1Δ* vemos como no solo los niveles iniciales de expresión de este gen son más bajos sino que además no presenta un incremento a lo largo del ayuno.

- *nim1*: este gen codifica para una serín treonin quinasa (Nim1/Cdr1) que participa en la regulación de la entrada en mitosis a través de su acción represora sobre la proteína Wee1.

(2) La respuesta frente al ayuno se ve retrasada o es inferior (los niveles de expresión que se alcanzan son más bajos) en el mutante respecto al wt. Esto se observa para varios genes:

- *cig2*: es una ciclina específica del paso G1/S (como ya hemos mencionado en la introducción). Durante el ayuno de nitrógeno esta ciclina se sobreexpresa durante la primera hora posiblemente para promover la replicación de aquellas células que se encontraban en G1, permitiendo de esta manera que se paren en el punto pre-start del siguiente ciclo.
- *ste9*: previamente ya hemos mostrado como la sobreexpresión de este gen durante el ayuno de nitrógeno es al menos en parte dependiente de la presencia de Reb1. La sobreexpresión de *ste9* en ausencia de Reb1 es más tardía y no alcanza los niveles del wt de manera que la parada en G1 de los mutantes es deficiente.
- *cdc18*: Es un cargador de MCMs, esta proteína es necesaria para la formación del complejo pre-replicativo, por lo tanto para la entrada en replicación. Este gen también muestra un ligero retraso en su expresión en los mutantes que carecen de Reb1.

RESULTADOS

(3) Inicialmente la expresión del gen es más alta en los mutantes que carecen de Reb1, pero a tiempos largos de ayuno la expresión presenta diferencias estadísticamente significativas. Este es lo que les sucede a los genes

- *ste11*: este gen codifica para un factor transcripcional clave involucrado en la respuesta al ayuno de nitrógeno para la diferenciación sexual y la entrada en meiosis (Mata and Bahler, 2006). Este gen presenta una mayor expresión en los mutantes deficientes en Reb1.
- *fbp1*: Codifica la proteína fructosa-1,6,bisfosfatasa una proteína involucrada en la gluconeogénesis. La expresión de este gen está regulada por dos vías antagónicas (la ruta PKA que actúa inhibiendo la expresión de *fbp1+* y la ruta de las MAPK que actúan activándola) (Neely and Hoffman, 2000). En su región promotora presenta dos elementos UAS que regulan su expresión UAS1 y UAS2 localizados a 900 pb y 250 pb en 5' del TSS, El sitio de unión de Reb1 se localiza aguas arriba de ambos UAS con a 2,7 kb, a pesar de ello la expresión en el mutante *reb1Δ* parece algo mayor a la del wt.
- *urg1*: Se trata de un gen que codifica para una proteína de la familia de las ciclohidrolasas II de GTP que están involucradas en la síntesis de riboflavinas. Este gen muestra una rápida inducción tras la adición de uracilo al medio y también tras la eliminación del nitrógeno del medio (su nivel de expresión aumenta más de 100 veces en tan solo una media hora de inducción) (Watt et al., 2008). Se ha visto que los primeros 232 pb aguas arriba de la secuencia del codon *start* promueven la expresión del gen mientras que el resto de la secuencia aguas arriba del promotor lo que hace es reprimir la expresión del gen en ausencia de uracilo. Reb1 se une a una secuencia (que presenta motivo de unión de Reb1) localizada a 350 pb del codon *start*. Este dato junto con el resultado visto mediante microarrays y qRT-PCR sugieren que la inhibición de la expresión de *urg1* en MM (en ausencia de uracilo) podría estar

RESULTADOS

mediada, al menos en parte, por la proteína Reb1. Esto explica porque los niveles de expresión iniciales en la estirpe *reb1Δ* son más altos que en el wt.

(4) Uno de los genes estudiados SPAC11G7.01 no presenta diferencias significativas en lo que se refiere a su expresión en los mutantes *reb1Δ* durante el ayuno de nitrógeno.

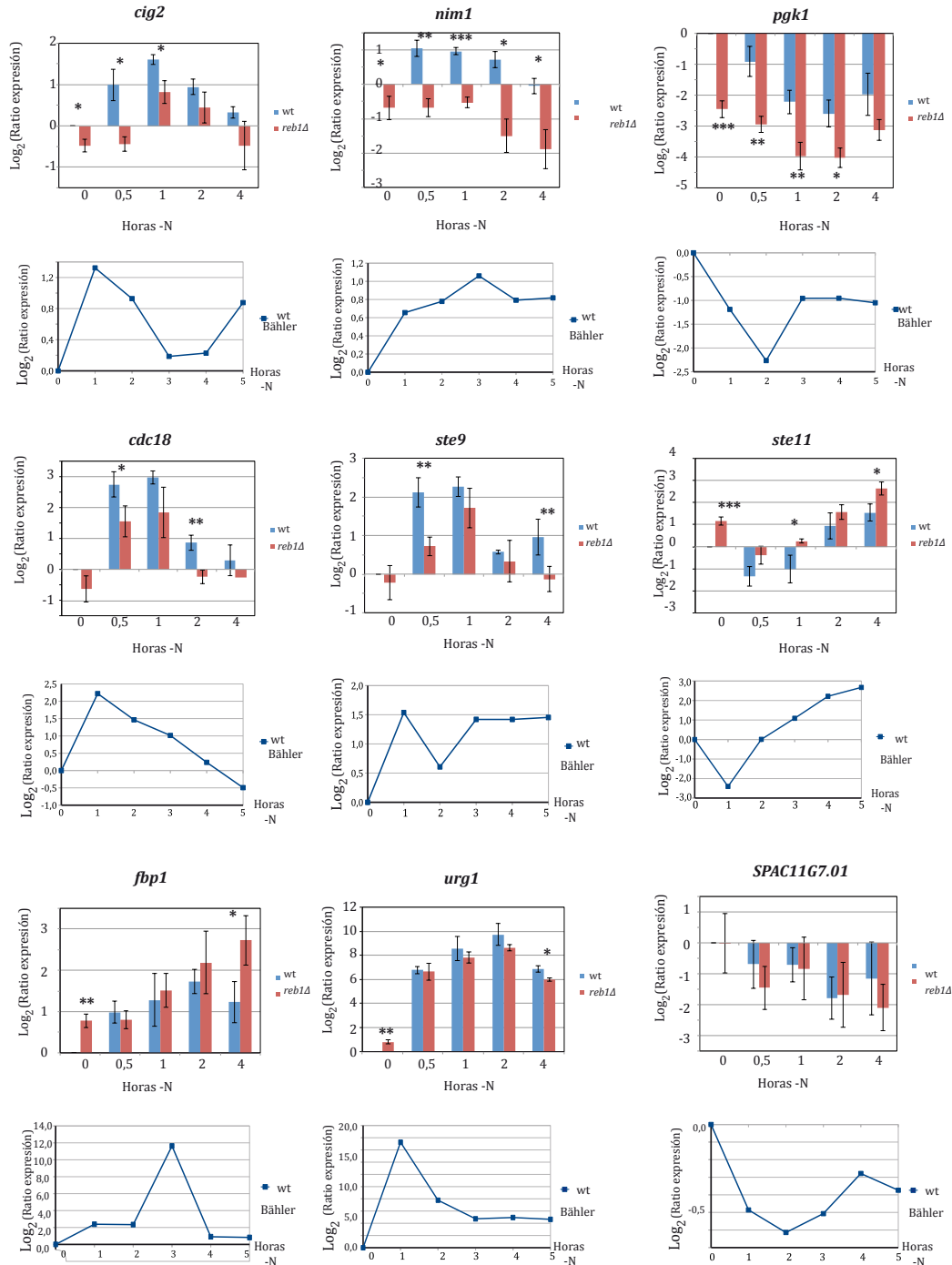


Figura 31. Estudio de la dependencia de Reb1 en la regulación de la expresión durante el ayuno de nitrógeno de genes que presentan pico de unión de Reb1-TAP en su extremo 5'. Representación del Log₂ del cociente de expresión de los RNAs mensajeros de los genes indicados obtenida mediante qRT-PCR, durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. El análisis estadístico se realizó

RESULTADOS

mediante una *t* de *Student* en la que se representan los valores como significativos *($p < 0,05$), altamente significativos ** ($p < 0,01$) y muy altamente significativos *** ($p < 0,001$). Debajo de cada cuantificación se representa el resultado de un experimento similar llevado a cabo por el laboratorio del Dr Bähler en una estirpe wt, estos datos están disponibles en la web <http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/geexview>. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas. Puesto que se representa el Log2, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación.

Por otro lado decidimos investigar la dependencia de Reb1 en la expresión de genes que no presentan pico de unión a Reb1 en su secuencia promotora. En la figura 32 podemos observar los resultados del análisis de la expresión a lo largo del ayuno de nitrógeno de los genes *cdc22* y *cgs1* cuya expresión se sabe que varía durante el ayuno de nitrógeno.

- *cdc22*: Este gen codifica para la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (Gordon and Fantes, 1986) fue uno de los primeros genes cuya regulación se vio asociada a un momento del ciclo, presentando un máximo de expresión en la transición G1/S. La transcripción de *cdc22* es dependiente del complejo MBF (Cunliffe et al., 2004; Maqbool et al., 2003) (contiene dos clusters de motivos de unión a MBF que regulan la expresión periódica). Como podemos observar la expresión de este gen durante el ayuno de nitrógeno no parece dependiente de la proteína Reb1.
- *cgs1*: Este gen codifica para la subunidad reguladora (dependiente de cAMP) de la proteína kinasa Pka1 (DeVoti et al., 1991; Maeda et al., 1994). El gen *cgs1* se describió como necesario para la salida del ciclo mitótico y entrada en la fase estacionaria G0 y para el paso a diferenciación sexual. (*cgs1 continues to grow in stationary*). Este gen presenta un motivo de unión a Reb1 (FIMO) en su promotor. Observamos como la expresión a tiempo 0 es diferencial, pero como durante el resto del ayuno no existen diferencias significativas en la expresión del gen *cgs1* entre las estirpes wt y las que carecen de *reb1*.

RESULTADOS

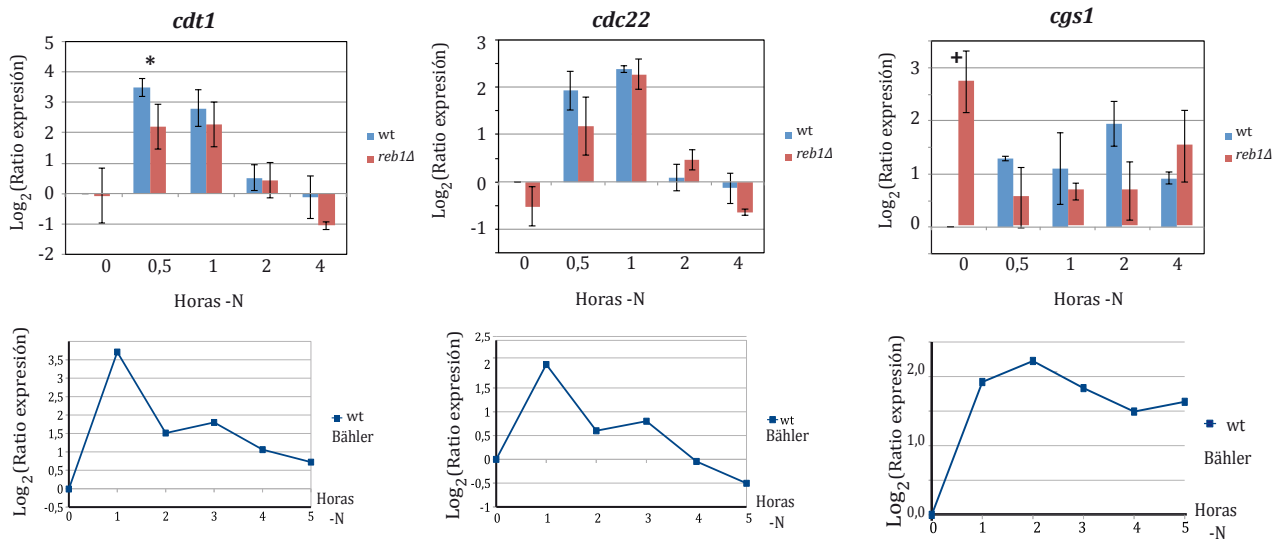


Figura 32. Estudio de la dependencia de Reb1 en la regulación de la expresión durante el ayuno de nitrógeno de genes que no presentan pico de unión de Reb1-TAP en su extremo 5'. Representación del Log₂ del cociente de expresión de los RNAs mensajeros de los genes indicados obtenida mediante qRT-PCR, durante el ayuno de nitrógeno (ver materiales y métodos) en una estirpe wt y en una *reb1Δ*. El análisis estadístico se realizó mediante una *t* de Student en la que se representan los valores como significativos * ($p < 0,05$), altamente significativos ** ($p < 0,01$) y muy altamente significativos *** ($p < 0,001$). En el caso de los tiempos 0, 1 y 4 del gen *cgs1* se recurrió al análisis de un test no paramétrico de *Kruskal-Wallis* ya que los datos no cumplían los requisitos mínimos para llevar a cabo un ensayo paramétrico. En este caso el nivel de significación establecido fue + ($p < 0,05$). Debajo de cada cuantificación se representa el resultado de un experimento similar llevado a cabo por el laboratorio del Dr Bähler en una estirpe wt, estos datos están disponibles en la web http://128.40.79.33/cgi-bin/SPGE/_geexview. En este caso el ayuno de nitrógeno duró 5 horas. Puesto que se representa el Log₂, el valor 0 significa que no hay cambios, cambios de una unidad significan un cambio de dos veces la expresión y así sucesivamente, se han normalizado todos los datos con respecto al valor de la expresión del wt en el tiempo 0 para que sea más sencilla su comparación.

4.5.6.2. Reb1 participa en la regulación de genes a los que no parece unirse

4.5.6.2.1. Reb1 participa en la regulación *ecl1+* durante el ayuno de nitrógeno y durante la saturación

Uno de los genes que presentaba mayor diferencia en su expresión en el mutante *reb1Δ* frente al wt que nos llamó la atención en el análisis de los microarrays fue el gen *ecl1+*. Este gen *ecl1* (extend of chronological lifespan) se describió como un gen cuya sobreexpresión cecidia a las células una mayor longevidad durante la fase estacionaria. En las células wt se produce

RESULTADOS

sobre expresión de este gen durante la entrada en saturación (Ohtsuka et al., 2008) y durante el ayuno de nitrógeno (Miwa et al., 2011).

En los microarrays de expresión vimos que aquellas células que carecen de la proteína Reb1 presentaban una expresión de *ecf1+* muy inferior al wt, durante el ayuno de nitrógeno. Puesto que este gen *ecf1+* parece que es necesario para prolongar la supervivencia en quiescencia, y nuestros mutantes *reb1Δ* son muy deficientes en el CLS en MM, decidimos hacer un estudio en mayor profundidad de la dependencia de Reb1 en la expresión de este gen, aunque el promotor de este gen carece de secuencias de unión a Reb1 (y tampoco hemos observado que haya unión de Reb1-TAP en las condiciones en las que realizamos el ChIP). Para ello crecimos células wt y *reb1Δ* hasta saturación en MM y analizamos el mensajero del gen *ecf1+* mediante *northerblot*. Como se observa en la figura 33 en ausencia de Reb1 no se produce el aumento de mensajero de *ecf1* característico de la entrada en saturación.

Los resultados expuestos más arriba sugieren que Reb1 está actuando de manera directa e indirecta sobre la expresión de varios grupos de genes tanto durante el ayuno de nitrógeno como durante la saturación. Es posible que el mecanismo de acción de la regulación de *ecf1+* por Reb1 sea a través de la regulación de algún activador transcripcional de *ecf1+*.

RESULTADOS

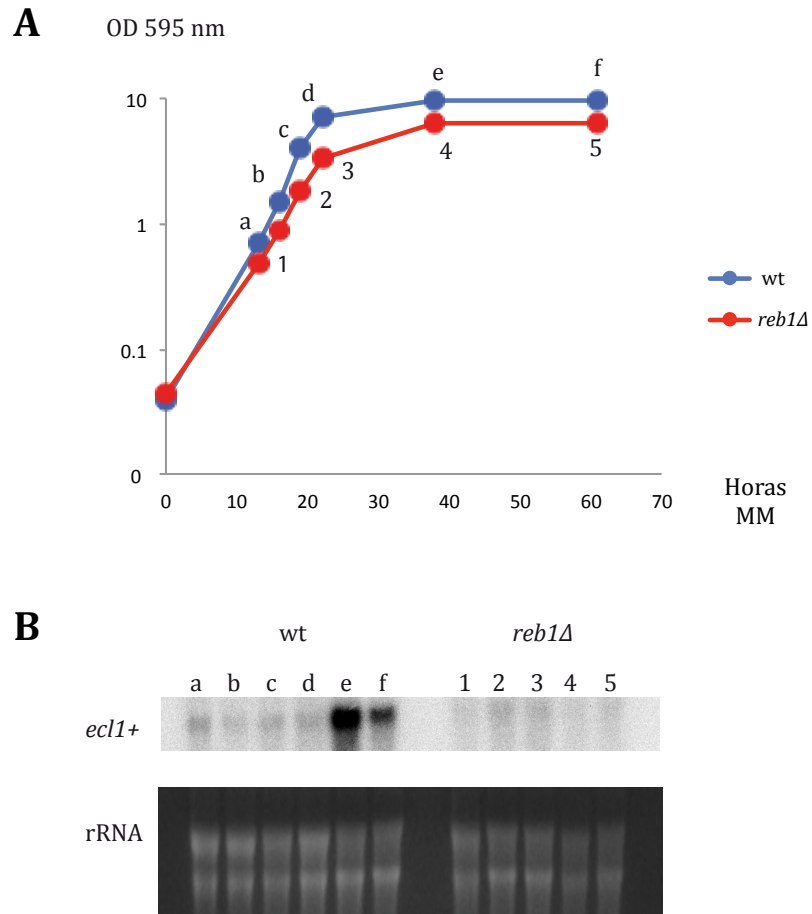


Figura 33. Estudio de la expresión del gen *ecl1+* durante la entrada en saturación en MM. **A.** Representación del aumento en densidad óptica (OD 595 nm) de cultivos de células wt y *reb1Δ* crecidos hasta fase exponencial. Los números y las letras señalan los puntos en los que se recogieron muestras para su posterior análisis. **B.** Northern-blot en el que se observa la expresión del gen *ecl+* durante la entrada en saturación de (A). Para la hibridación se utilizó una sonda del mensajero de *ecl1+*. Como control de carga se muestra la tinción con bromuro de etidio del gel en la que se pueden observar las dos bandas del rRNA.

DISCUSIÓN

5.1. La proteína Reb1 de *Schizosaccharomyces pombe* es una proteína multifuncional

Como ya mencionamos en la introducción la proteína tipo MYB Reb1 es conocida por ser necesaria para la generación de las barreras para las horquillas replicativas 2 y 3 del rDNA. En la presente tesis doctoral hemos visto que además de ejercer esta función, Reb1 participa en la regulación de la transcripción de varios genes como respuesta al ayuno de nitrógeno. Contribuye a la regulación de la expresión de estos genes tanto de manera directa, por medio de su unión a la región reguladora de los mismos (como es el caso de los genes *cig2+*, *ste9+*, *nim1+* ...) como de manera indirecta (participa en la regulación de la expresión de *ecf1+*). Además hemos mostrado que Reb1 es necesaria para la supervivencia de las células cuando estas se encuentran en fase estacionaria en medio mínimo.

La regulación de la transcripción es un mecanismo de vital importancia para la supervivencia de la célula, este proceso está controlado de manera muy precisa. Para las células es esencial que en cada instante se exprese aquello que es necesario. Esta regulación se hace en múltiples niveles desde el propio proceso de la transcripción hasta el control de la estabilidad o degradación de los mensajeros, todo esto junto con la regulación de la tasa de síntesis proteica llevará a la generación de niveles controlados de proteína que es en última instancia el producto de la expresión génica y la encargada de ejercer la función. La unión de complejos proteicos al DNA puede establecer cambios conformacionales en la estructura de la cromatina que promuevan la expresión o represión de los genes. El primer nivel de regulación se encontraría en estas proteínas denominadas factores transcripcionales, por otro lado estas proteínas se encuentran reguladas en muchos niveles como por ejemplo mediante cambios en su estructura debidos a modificaciones post-traduccionales, que favorecen o impiden su unión al DNA o a otras proteínas necesarias para la expresión, estas modificaciones también pueden genera cambios en la localización sub-celular de las proteínas.

DISCUSIÓN

5.1.1. Reb1 se une preferentemente a regiones reguladoras de los genes

Reb1 reconoce una secuencia de DNA de 17 pb en la región 3' del rDNA (Zhao et al., 1997). En la presente tesis doctoral hemos observado la unión de Reb1 a otras regiones del genoma de *S. pombe*. Del total de 83 picos de unión de Reb1 caracterizados mediante la técnica de ChIP-seq, más del 50% de ellos presentan un motivo de unión al DNA común al que hemos denominado “motivo de unión de Reb1” (Figura 22B). Este motivo de 14 pb está presente en la secuencia de 17 pb de unión al rDNA descrita anteriormente. Mediante esta técnica (en las condiciones experimentales indicadas) se aprecia que la unión de Reb1 ocurre en las regiones reguladoras de los genes, en la mayoría de los casos la unión de Reb1 se da en la región 5' de los genes próxima al TSS, y con menos frecuencia observamos unión de la proteína a la región aguas abajo de la secuencia codificante de los genes.

Previamente se describió que la unión de Reb1 al rDNA genera barreras para las horquillas replicativas de los genes ocurría de manera polar (Krings and Bastia, 2004; Sánchez-Gorostiaga et al., 2004). En el rDNA Reb1 se une a una región situada aguas abajo de la región codificante del rDNA. La unión de Reb1 a esta región bloquea el avance de las horquillas replicativas que progresan en sentido contrario al de la transcripción de los genes ribosómicos. En *S. cerevisiae* se ha descrito que las secuencias codificantes de algunos genes con elevada tasa transcripcional son sitios naturales de parada de las horquillas replicativas (Azvolinsky et al., 2009) y esta parada ocurre independientemente de la orientación en la que se transcribe el gen. En *S. cerevisiae* la parada o ralentización de horquillas replicativas en los genes altamente replicados no está condicionada por la ausencia de la helicasa Rrn3 (esta levadura tiene 2 helicasas de tipo Pif1, Rrn3 y Pif1 que en ocasiones actúan sobre las mismas dianas con funciones opuestas). En *S. pombe* también se ha observado que algunos genes altamente transcritos actúan como impedimentos para el avance de las horquillas replicativas (Sabouri et al., 2012) pero en esta levadura la helicasa Pfh1 ayuda a la progresión del avance de las horquillas replicativas.

DISCUSIÓN

En el caso de las secuencias de unión de Reb1 (con motivo de unión de Reb1), localizadas en los lugares del genoma fuera de la región del rDNA, la unión se produce preferentemente en la región 5' del gen. Por esta razón decidimos investigar cuál es la posición del motivo de unión de Reb1 a las secuencias promotoras de estos genes. En la figura 22 D observamos como Reb1 se une a la mayoría de los promotores de manera que bloquearía las horquillas replicativas que avanzan en el mismo sentido que la transcripción del gen a cuyo promotor se están uniendo (para ver ejemplos ilustrados Figura 23). En la figura 25 observamos como la unión de Reb1 a las regiones promotoras de los genes *kes1*, *urg1* y SPAC11G7.01 genera parada de las horquillas replicativas que avanzan en sentido favorable a la transcripción de los mismos. Por lo que **Reb1 participa en el bloqueo de las horquillas replicativas que avanzan en sentido co-transcripcional en las regiones promotoras de algunos de los genes a los que se une.**

5.1.2. Reb1 se une al origen de replicación del rDNA

Mediante la técnica de ChIP-seq no hemos podido observar picos de unión de Reb1 a los motivos de unión de Reb1 en las RFBs del rDNA debido a las limitaciones del programa informático usado para la detección de los picos de unión. Sin embargo el estudio de ChIP-seq nos ha permitido localizar un nuevo sitio de unión de Reb1 en la región del rDNA. Este se encuentra en el *ars3001*, el origen de replicación localizado entre dos copias de rDNA. La unión de Reb1 a este origen podría estar dándose a través de dos sitios de unión ya que esta secuencia presenta dos motivos de unión de Reb1. En la figura 24 observamos como la unión de Reb1 genera un bloqueo para las horquillas replicativas que progresan desde la copia que se encuentra aguas abajo del origen de replicación. **La presencia de estas barrera dependiente de Reb1 en el origen de replicación podría explicarse como un mecanismo adicional para impedir el avance de horquillas replicativas en sentido contrario de la transcripción de los genes de rDNA, para favorecer la replicación unidireccional del**

DISCUSIÓN

rDNA. Asimismo Reb1 podría estar regulando el disparo del origen de replicación del rDNA, para dilucidar esto se procederá a la realización de un estudio de la activación de este origen y su dependencia de Reb1.

5.1.3. Reb1 participa en la respuesta transcripcional durante el ayuno de nitrógeno

En la presente tesis doctoral hemos constatado la capacidad de Reb1 para actuar como factor transcripcional a través de su unión a las regiones promotoras de genes que varían su expresión durante el ayuno de nitrógeno.

Debido a la disminuida fertilidad de las células deficientes para la proteína Reb1 y puesto que los genes ortólogos en otros organismos actúan como reguladores transcripcionales localizamos el motivo de unión de Reb1 al promotor de *ste9+*. La unión de Reb1 al promotor de este gen es necesaria pero no suficiente para la sobreexpresión del mensajero de *ste9+* (sección 4.1.2) inducida por el ayuno de nitrógeno. Reb1 se encuentra unido al promotor de este gen incluso antes de la eliminación del nitrógeno del medio, por eso planteamos la hipótesis de que Reb1 estaría unido siempre al promotor de *ste9+* junto con las denominadas proteínas reguladoras negativas (que podrían ser las que forman los complejos que no somos capaces de explicar por polimerización de Reb1 en los EMSAs, ver figura 19). Las proteínas reguladoras negativas podrían disociarse de Reb1 cuando esta se procesa durante el ayuno de nitrógeno, ya que este procesamiento elimina el dominio de dimerización de Reb1, permitiendo la activación de la actividad pro-transcripcional de Reb1.

Mediante la técnica de ChIP-seq hemos sido capaces de identificar otros sitios de unión de Reb1 en el genoma de *S. pombe*. Como ya hemos mencionado anteriormente Reb1 se une preferentemente a las regiones reguladoras de los genes. Los ensayos preliminares de microarrays de expresión nos permitieron hacer un análisis de la expresión en respuesta al ayuno de nitrógeno de los genes a cuyos promotores se une Reb1. De esta manera fuimos capaces de observar que además de *ste9+* existen otros genes que responden al ayuno de nitrógeno de manera dependiente de Reb1, como se puede observar en los genes *cig2+*,

DISCUSIÓN

nim1+, *cdc18+* y *ste9+* de la figura 31. En estos genes, la respuesta transcripcional se ve reducida o retardada en las células que carecen de Reb1. El caso del gen *pgk1+* es algo distinto, durante el ayuno de nitrógeno su expresión disminuye, en la estirpe que carece de Reb1 la expresión inicial del gen es más de 4 veces menor que en el wt. La estirpe wt reprime la expresión de este gen durante el ayuno de nitrógeno y en la estirpe *reb1Δ* esta represión es mayor, por lo que Reb1 es necesaria para alcanzar los niveles de expresión de *pgk1* del wt.

De lo arriba expuesto concluimos que **Reb1 participa en la regulación de la respuesta transcripcional al ayuno de nitrógeno de genes a cuyo promotor se une.**

Es curioso que durante el ayuno de nitrógeno inicialmente se activa la expresión de *cig2+* que es una de las quinasas starter que promueven la entrada en replicación (ver figura 31). Esta activación sucede durante la primera hora de ayuno, posteriormente la expresión cae hasta niveles casi basales. Con el gen *cdc18+* sucede algo parecido, esta proteína es necesaria para el inicio de la replicación (Baum et al., 1998). Sus niveles comienzan a aumentar según las células salen de mitosis cuando la actividad quinasa del complejo CDK decae, puede acumularse ya que Cdc2 marca para degradación a Cdc18 por fosforilación. Durante G1, Cdc18 se acumula para promover la entrada en S, posteriormente en la fase de replicación la transcripción de *cdc18+* se inhibe para evitar una nueva entrada en replicación. La expresión de *cig2+* y la de *cdc18+* está promovida por el complejo transcripcional MBF, por eso decidimos hacer el estudio de otros genes regulados por MBF. De hecho cuando analizamos la cobertura en secuencias (del ChIP-seq) observamos que hay un enriquecimiento que tiene el típico aspecto de pico en dos de los sitios de unión a MBF que se encuentran en el promotor de Cdc22. La expresión cíclica de Cdc22 está regulada por MBF, presenta varios sitios de unión a este complejo (Maqbool et al., 2003). La regulación principal se encuentra en el sitio de unión a MCB localizado en la zona transcrita (si se elimina este sitio, entonces no se produce transcripción del gen). Los dos sitios de unión de la región 5' (donde eventualmente se podría estar uniendo Reb1) corresponden a reguladores específicos de ciclo, que actúan

DISCUSIÓN

como represores de la expresión, puesto que si se eliminan se produce la expresión del gen. Estos clusters son dependientes de orientación, podría ser que Reb1 se una y regule la expresión de estos genes dependientes de MBF. Mediante ensayos EMSAs se ha observado que además de DSC1 parece haber mas complejos, que aparecen incluso cuando no está presente la proteína Cdc10 (Maqbool et al., 2003), pensamos estos complejos podrían deberse a Reb1. Un estudio similar en células *reb1Δ* nos permitiría ver si Reb1 participa en la formación de estos complejos, ensayos “footprinting” sugieren que tal vez haya alguna otra proteína que se está uniendo a esta región, esta podría ser Reb1. En *S. pombe* la secuencia “consenso” de unión a MBF está menos definida que la de *cerevisiae* consistiendo en un núcleo de CGCG con As o Ts en uno u otro extremo. Algunos genes regulados por este complejo presentan un patrón complejo de secuencias de unión a MBF como serían *cdc22+*, *cdc18+*, *cig2+*, *cdt1+* y *cdt2+* y se creen que la orientación de las secuencias podría estar actuando como elemento regulador de la expresión,.

5.1.4. El procesamiento de Reb1 podría actuar como activador de su función como regulador transcripcional positivo

La proteína Reb1 de *S. pombe* presenta varias isoformas, la proporción de estas isoformas depende del medio en el que están creciendo las células. La forma completa es procesada durante el ayuno de nitrógeno hasta la isoforma de menor tamaños. También se ha descrito la presencia de varias proteínas que se unen a la secuencias de las cajas *sal* de humanos (Pfleiderer et al., 1990), se cree que podría tratarse de varias isoformas de la misma proteína. El ortólogo en mamíferos, TTF-1 es una proteína de gran tamaño de unos 130 kDa (Evers et al., 1995) que parece muy sensible a proteólisis por lo que se suele aislar como un grupo de polipéptidos de menor tamaño. Estos péptidos presentan una mayor capacidad de unión al DNA. El clonaje de TTF-1 fue complicado porque es una proteína poco abundante y presenta una variedad amplia de isoformas. Cuando los autores intentaron clonarla en *E. coli* comprobaron que es problemático el clonaje de la forma entera por lo que se procedió al

DISCUSIÓN

clonaje de una forma de la proteína con un truncamiento en su extremo N-ter. Algunos factores transcripcionales como NF κ B y p53 se unen con mayor afinidad al DNA cuando sufren procesamiento (Sander et al., 1996).

En *S. pombe* se ha comprobado que la afinidad por el DNA de una forma truncada de Reb1 en su extremo amino terminal (Biswas and Bastia, 2008; Singh et al., 2010) presenta la misma afinidad por el DNA que la forma completa. En la presente tesis se ha comprobado **que durante el ayuno de nitrógeno Reb1 se procesa y que es necesaria para la sobre expresión de algunos genes cuya respuesta es dependiente del ayuno de nitrógeno. El procesamiento de Reb1 durante el ayuno podría estar promoviendo la actividad transcripcional de Reb1.**

5.1.5. Reb1 podría participar en la localización nuclear de los genes que regula

Los genes no se encuentran distribuidos de manera aleatoria a lo largo del genoma, muchos se encuentran organizados en regiones o agrupaciones denominadas “clusters” que guardan correlación con el modo de regulación de su expresión. La regulación transcripcional que lleva a la diferenciación sexual en *S. pombe* comienza en respuesta a una disminución del nitrógeno del medio. En esta levadura un gran número de genes, más de 250 (Mata et al., 2002), varían su expresión en ausencia de nitrógeno, esta respuesta transcripcional se produce en forma de varias “oleadas transcripcionales”. Durante la primera hora tras la eliminación del nitrógeno del medio se ha observado la regulación de 5 clusters génicos localizados en los cromosomas I y II. Cuatro de los grupos de genes de respuesta temprana al ayuno de nitrógeno se encuentran situados en en las subteloméricas de los cromosomas I y II y el quinto grupo se localiza en la región media del brazo izquierdo del cromosoma I (Kristell et al., 2010; Mata et al., 2002). Los clusters de genes de respuesta a la falta de nitrógeno del brazo izquierdo del cromosoma I, además, cambian su localización en respuesta a la ausencia de nitrógeno. Ambas regiones se localizan en la periferia nuclear, en las proximidades del nucleolo, cuando las

DISCUSIÓN

células se encuentran creciendo en presencia de nutrientes en MM. Como respuesta al ayuno de nitrógeno en tan solo 20 minutos ambos “clusters” cambian su localización y se desplazan hacia el interior del núcleo hacia las proximidades del SPB (Spindle pole body, que es el equivalente en levaduras a los centriolos) (Alfredsson-Timmins et al., 2009). Este cambio de localización de los “clusters” de respuesta al ayuno de nitrógeno parece ser dependientes de la actividad de la proteína histona desacetilasa Clr3. Se sabe que esta proteína interviene en el silenciamiento de los loci del *mating type* y del rDNA.

La respuesta transcripcional al ayuno de nitrógeno viene precedida por una disminución de la abundancia de nucleosomas (tanto en la región promotora como en la codificante) en los genes que se van a sobreexpresar que está acompañada de una variación en los niveles de acetilación de la histona H3 (Kristell et al., 2010). La activación génica en estos clusters de respuesta al ayuno de nitrógeno parece ser la causa del movimiento de los mismos puesto que la inhibición de la activación de la transcripción con 1,10-fenantrolina bloquea el movimiento, por lo menos en uno de los clusters. Cuando la proteína Clr3 está ausente se produce una deslocalización de ambos clusters de respuesta al ayuno de nitrógeno y la des-represión de los genes asociados a los mismos. Se cree que Clr3 presentaría una actividad dual, por un lado podría encargarse de formar una estructura cromatínica específica con abundancia de histonas hipoacetiladas y por el otro podría jugar un papel más bien estructural para mantener a ambos clusters en su localización nuclear próxima al nucleolo.

En los últimos años se ha descubierto que la membrana nuclear, lejos de ser un mero contenedor del material genético, tiene además la capacidad de estructurar la compleja organización de la cromatina de manera que influye en múltiples procesos biológicos, en muchos metazoos se ha observado un enriquecimiento de cromatina silenciada o de baja expresión en las proximidades de la membrana nuclear. Sin embargo, aunque existen evidencias de la presencia de territorios cromosómicos en levaduras, se conoce poco sobre la organización su núcleo. En las células en crecimiento vegetativo de *S. pombe* el núcleo se

DISCUSIÓN

compone de dos hemisferios, uno rico en RNA que compone el nucleolo y el otro rico en eucromatina. Esta levadura carece de las proteínas de la lámina nuclear pero presenta otras proteínas de cubierta que tienen dominios de interacción similares denominados dominos-LEM.

Durante la interfase en *S. pombe* los centrómeros de los tres cromosomas se encuentran localizados en la periferia nuclear diametralmente opuestos al SPB. Los telómeros también muestran una localización preferente por la periferia. La cromatina silenciada suele formar agrupaciones que se localizan próximas al nucleolo y la periferia nuclear tanto en levaduras, como en moscas y en las células diferenciadas de mamíferos. Estudios en *S. pombe* muestran una localización preferencial de genes poco expresados o reprimidos en la periferia nuclear (Steglich et al., 2012) mientras que los genes altamente expresados tienden a localizarse hacia el interior del núcleo, aunque existe cierta controversia al respecto. Además los promotores de estos genes que se encuentran reprimidos o de baja expresión se colocan de tal manera que la transcripción de los genes tendría lugar hacia el interior del núcleo no hacia la periferia. Existe una gran correlación de localización de la maquinaria de RNAi y la proteína de la membrana nuclear Ima1 lo que sugiere que Dcr1 (uno de los componentes de RNAi) se localiza en la periferia nuclear y que la interferencia RNAi sucede en compartimentos especializados dentro del núcleo.

La organización de los puntos de anclaje de la cromatina a la membrana no sucede de manera aleatoria, en los poros nucleares se ha observado la asociación entre el factor transcripcional de respuesta a estrés Atf1 y la maquinaria de RNAi (Woolcock et al., 2012). Atf1 se encuentra unido de manera constitutiva a sus genes dianas. En presencia de estrés, este factor transcripcional de tipo cremallera de leucina, es fosforilado lo que conlleva a su activación promoviendo la sobreexpresión de sus genes diana (Eshaghi et al., 2010). A través de su localización en los poros nucleares (también denominada “*gene gating*”) permite la rápida exportación de los mensajeros de proteínas de respuesta a estrés en el momento de la

DISCUSIÓN

activación de esta respuesta, y mediante esta colocación con la maquinaria de RNAi se permite la regulación específica durante el estrés, de manera que la maquinaria de RNAi estaría participando en la degradación co-transcripcional (según son sintetizados) de los mensajeros cuando estos no son necesarios (Woolcock et al., 2012).

Los resultados de nuestro estudio de ChIP-seq muestran que la mayoría de las regiones de unión de Reb1 se localizan en los cromosomas I y II (si descontamos la unión de Reb1 a las RFBs y origen de replicación del rDNA). Además hemos observado la localización de sitios de unión de Reb1 en los “clusters” de respuesta a ayuno de nitrógeno. Nuestros resultados muestran que por alguna razón el cromosoma III encuentra más libre de sitios de unión a Reb1, podríamos pensar que esta reducción en el porcentaje de sitios de unión de Reb1 podría deberse al hecho de que el brazo izquierdo del cromosoma III no presenta genes de respuesta a nitrógeno (Kristell et al., 2010).

Reb1 presenta una localización pan-nucleolar. Como ya hemos mencionado antes la proteína Reb1 presenta un dominio de dimerización (Biswas and Bastia, 2008) que le permite interaccionar consigo misma o con otras proteínas como hemos mostrado en la figura 19. Mediante la técnica de Captura Conformacional Cromosómica Circular (4C) se demostró que Reb1 permite la interacción entre regiones cromosómicas distantes (Singh et al., 2010), se observó la interacción entre el sitio de unión de Reb1 en el locus del gen *kes1+* en el cromosoma II (en nuestro análisis también hemos detectado esta unión) y dos sitios más del genoma de *S. pombe* en los que también hemos detectado unión de Reb1 los loci del gen *ste9+* (localizado en el cromosoma I y cuya expresión durante el ayuno de nitrógeno es dependiente de Reb1) y el sitio de unión de Reb1 localizado entre los genes *cyp8* y *tif224* (localizado en el cromosoma I). Este tipo de interacciones a distancia se conoce con los términos “transvection” o “Chromosome kissing” y facilitan la interacción de regiones de cromosomas distintos permitiendo realizar un control de la función de los loci de ambos cromosomas. Reb1 es capaz de actuar uniendo dos regiones localizadas en *trans* en el genoma gracias a su capacidad de

DISCUSIÓN

dimerizar. Se ha observado que la formación de “loops cromosómicos” mediada por Reb1 favorecen el bloqueo de las horquillas replicativas (Singh et al., 2010) al menos en el locus de *kes1*, como ya mostramos en la figura 25. Nuestros resultados no mostrados indican que en el promotor de *ste9* Reb1 no genera barreras para las horquillas replicativas, indicando que a pesar de que Reb1 parece unir los locus de *kes1+* y de *ste9+* no produce el mismo tipo de respuesta. Como ya hemos mencionado previamente se ha descrito la presencia de parada de horquillas replicativas en las regiones de genes transcritos además de los sitios previamente descritos como las RFBs del rDNA, genes tRNA, locus del mating type y regiones teloméricas.

5.1.5.1. Modelo de regulación transcripcional en respuesta al ayuno de nitrógeno mediada por Reb1

Mediante un programa de predicción informática de interacciones proteicas (Pancaldi et al., 2012) se ha pronosticado la posible interacción entre Reb1 y la proteína Clr3, de la que hemos hablado anteriormente, que participa en el silenciamiento de los loci del mating type y del rDNA y es necesaria para la localización de los cluster de respuesta al ayuno de nitrógeno. Esta predicción junto con los resultados anteriormente descritos nos han llevado al planteamiento del modelo expuesto en la figura 34:

Reb1 podría estar actuando como un puente de anclaje entre distintas regiones del genoma regulando la localización “física” de las mismas mediante “*chromosome kissing*”. Puesto que Reb1 se une a dos de los clusters de respuesta al ayuno de nitrógeno, podría ayudar a la localización próxima al nucleolo de estos clusters (A), permitiendo la represión de estos genes en ausencia de estrés. Puesto que Reb1 es rápidamente procesada durante el ayuno de nitrógeno (B) (perdiendo de este modo la capacidad de dimerizar), se produciría la liberación de esta cromatina, facilitando el movimiento de los clusters (C) a la zona de alta actividad transcripcional. Puesto que la unión de Reb1 a los promotores de estos genes de respuesta al estrés nutricional es necesaria pero no suficiente para la activación transcripcional de los mismos se podría establecer una analogía con lo que le sucede al factor transcripcional de

DISCUSIÓN

respuesta al estrés Atf1. En el caso de la proteína Reb1 la forma completa se encontraría unida a los promotores, esta forma completa se encontraría en estado polimérico con sigo misma u otras proteínas permitiendo exclusivamente la expresión basal de los genes, y sería la forma truncada (generada en respuesta al ayuno) la que promovería la sobreexpresión dependiente del ayuno de nitrógeno. Es importante destacar que muchos de los genes de respuesta temprana al ayuno de nitrógeno presentan un pico de sobreexpresión a la hora del ayuno pero posteriormente vuelven a su estado basal. La progresión del procesamiento de Reb1 durante el ayuno (D) podría servir para “apagar” de nuevo la expresión de estos genes.

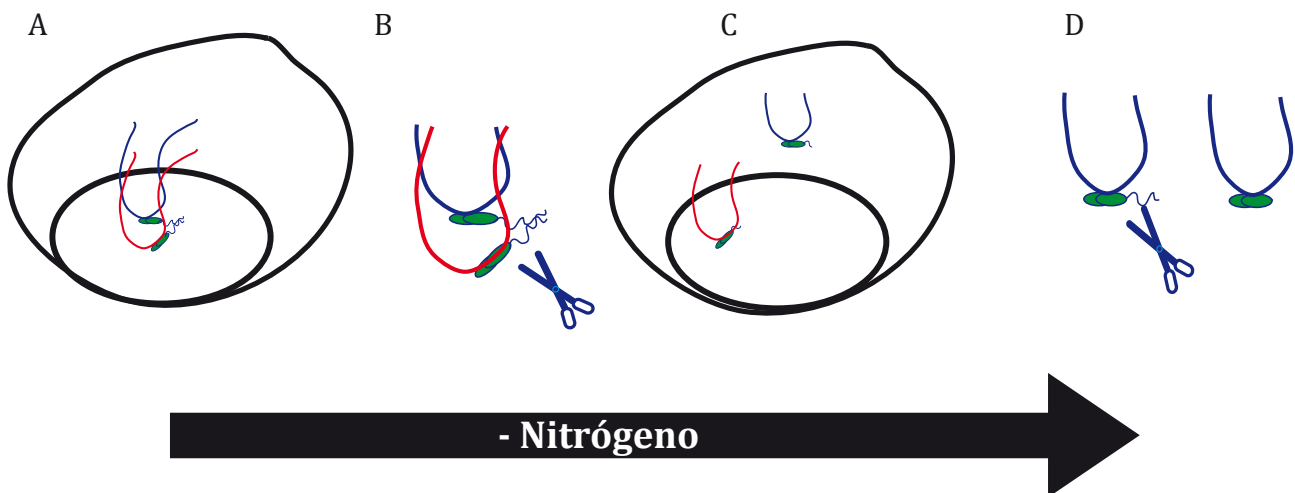


Figura 34. Modelo de la actividad represora/promotora de la expresión de genes de respuesta a estrés nutricional mediada por Reb1.

5.1.6.Reb1 podría interaccionar con la histona demetilasa Lsd1 favoreciendo el bloqueo de las horquillas replicativas en el rDNA

Recientemente se ha observado que la delección del gen *lsd1* (Lysine specific demethylase) de *S. pombe* hace desaparecer las barreras 2 y 3 del rDNA (las que requieren de Reb1) (Holmes et al., 2012). En *S. pombe* existen dos histona-demetilosas, Lsd1 que es necesaria para un crecimiento óptimo de las células y Lsd2 que es una proteína esencial para esta levadura (Lan et al., 2007). Ambas proteínas forman parte de un complejo multiproteico del que todavía no se han identificado todos los componentes. La actividad de al menos una de las dos es

DISCUSIÓN

necesaria para que se produzca la pausa en el locus MPS1 requerida para “*imprinting*” en el locus del *mating type*. Por lo que tanto Lsd1 como Lsd2 parecen jugar un papel en el control de la replicación polar, que se situaría por encima de Swi1 y Swi3, ya que se requiere de la presencia de Lsd1 para que Swi1 se una al MPS1 pero no al revés, en la región de las RFBs se observa una dependencia de la actividad de Lsd1 para la unión de Swi1, pero la unión de Lsd1 también se ve reducida en esta región en el mutante que carece de Swi1. Se ha comprobado que hay un enriquecimiento de Lsd1 en las RFBs del rDNA y como ya hemos mencionado esta proteína es necesaria para la aparición de las barreras para las horquillas replicativas de esta región. Además se ha detectado que la proteína Lsd1 participa en los elementos de la frontera entre eucromatina y heterocromatina.

Uno de los niveles de regulación de la actividad transcripcional viene marcado por las modificaciones que pueden sufrir las histonas en sus colas N-terminales, generalmente estas modificaciones se dan en los residuos de lisina (K) y de arginina (R). Una modificación que se ha asociado a distintos tipos de estructura de la cromatina es la metilación de histonas. Por lo general se asocia la metilación en la lisina 4 de la histona H3 (**H3K4**) a la **activación transcripcional** mientras que la metilación en la lisina 9 se suele asociar a la **represión transcripcional (H3K9)**. El ortólogo en mamíferos LSD1/KDM1B modula su actuación como represor de la transcripción o como activador de la transcripción por medio de su interacción con otras proteínas de unión al DNA. Se ha observado que la interacción con el complejo CoREST (que tiene dominio de interacción con el DNA de tipo SANT que es un dominio de unión al DNA muy similar a los dominios tipo myb) permite la represión transcripcional ayudando a la estabilización de la LSD1 y brindándole acceso a los nucleosomas y al DNA. Por otro lado la unión de LSD1 al receptor de andrógenos le confiere la propiedad de activar la transcripción mediante la demetilación de H3K9 en los promotores diana.

Las evidencias sugieren que **Lsd1 podría estar participando junto con Reb1 en la generación de las barreras para las horquillas replicativas de la región del rDNA**, no

DISCUSIÓN

podemos descartar que esta interacción sea necesaria para la aparición de las barreras en los otros sitios de unión de Reb1 en el genoma de *S. pombe*.

5.1.7. La delección del gen *reb1+* disminuye la fertilidad de las células pero no genera esterilidad

Anteriormente ya hemos descrito que la sobreexpresión de *ste9+* que se produce como consecuencia del ayuno de nitrógeno, y que conlleva en última instancia a la parada de las células en G1 para su posterior diferenciación sexual, es dependiente de Reb1. Los fenotipos de esterilidad de *rum1Δ* y de *ste9Δ* se suprimen si se elimina la “ciclina starter Cig2” (Kitamura et al., 1998; Martin-Castellanos et al., 1996; Yamaguchi et al., 1997). Tanto los genes *ste9+* como *cig2+* presentan pico de unión de Reb1 (tabla 3) y la sobreexpresión dependiente de ayuno de nitrógeno de ambos también parece estar regulada por Reb1 (datos de microarrays, Figura 8 para *ste9+* y Figura 31 para *cig2+*). Los mutantes *reb1Δ* presentan una disminución de su eficacia de apareamiento (Figura 7A.) que inicialmente habíamos asociado a la deficiencia en la expresión de *ste9+*. Esta explicación, sin embargo, no da cuenta de porqué los mutantes que solo tienen mutada la secuencia del promotor de *ste9* presentan una pérdida mayor en la capacidad de apareamiento. **Pensamos que las deficiencias en la expresión de *cig2+* en el mutante *reb1Δ* podrían estar compensando la deficiencia en la expresión de *ste9* (de manera análoga a lo que sucede con los mutantes dobles *ste9Δ cig2Δ*), de manera que en la estirpe mutP*ste9* la expresión de *cig2+* sería normal lo que generaría una disminución de la fertilidad de estas células.**

5.1.8. Reb1 participa en el control de las transiciones G1/S y G2/M

En condiciones normales la levadura *S. pombe* se divide cuando alcanza un tamaño definido. Para poder mantener el tamaño en el momento de la división es muy importante poseer un estricto control sobre el crecimiento y el momento de la división celular. La levadura de fisión crece principalmente por los polos permaneciendo su diámetro constante, de manera que el crecimiento longitudinal es una una medida correcta del tamaño de la célula. En *S. pombe* la

DISCUSIÓN

regulación precisa de este mecanismo de control de tamaño está relacionada con la regulación de la actividad CDK (Nurse, 1990; Nurse and Thuriaux, 1980). Durante la transición G2/mitosis se da un control de tamaño celular que impide la entrada en mitosis de las células si estas no han alcanzado la longitud correcta. Este control mitótico es a su vez sensible al estado nutricional de las células, puesto que se observa una alteración en la tasa de división y en el tamaño en la división dependiente del medio en el que se encuentren las células, por lo general las células creciendo en medios con menor concentración de nutrientes presentan un tamaño más pequeño.

Como hemos mencionado previamente en la introducción la actividad CDK en el momento de la transición G2/mitosis está regulada por las señalizaciones antagónicas de las quinasas Wee1 y Mik1 (actúan como inhibidores de la actividad CDK del complejo Cdc2-Cdc13) y de la fosfatasa Cdc25.

Dos rutas de señalización regulan la fosforilación de Cdc2 por encima de Wee1 y Cdc25. Por un lado la ruta de señalización de respuesta a nutrientes denominada TOR (Target of rapamycin) que modula la activación de Cdc2 en respuesta al estado nutricional y por otro lado la ruta que controla la entrada en mitosis dependiente de la geometría de la célula mediada por las quinasas Pom1, Cdr2 y Cdr1 (o Nim1). Estas quinasas regulan un gradiente de la proteína inhibitoria de Wee1 Pom1 (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009).

5.1.8.1. Reb1 regula la transición G1/S en condiciones de estrés nutricional

Como ya hemos abordado en varias ocasiones Reb1 regula la expresión de al menos cuatro genes en respuesta al ayuno de nitrógeno. Entre ellos se encuentran dos que modulan el paso de G1 a mitosis. Por un lado se encuentra la regulación del gen *ste9+* sobre el que no vamos a insistir más y por otro lado participa en la regulación de la expresión de *cig2+*. Cig2 como se ha expuesto previamente es una de las denominadas “*quinasas Starter*” cuya expresión favorece el inicio de la replicación de manera que en respuesta al ayuno aquellas células que

DISCUSIÓN

estaban apunto de replicar de manera que tras sufrir la consecuente mitosis podrán detenerse en el momento *pre-start* de G1 del siguiente ciclo.

5.1.8.2.Reb1 participa en la regulación de G1 en ausencia de estrés nutricional

Los resultados expuestos en los apartados anteriores, indican que Reb1 juega un papel importante en la respuesta celular al estrés nutricional, promoviendo la parada en G1 necesaria para la diferenciación sexual. En *S. pombe*, la célula recién nacida tras la mitosis tiene un tamaño suficiente para iniciar un nuevo ciclo de división, entrando en la fase S tras pasar el punto “start”. Por esta razón, el periodo entre fin de mitosis y el “start” es extremadamente corto en células creciendo bajo condiciones favorables. Las células *reb1Δ* no están afectadas en su crecimiento cuando este ocurre en un medio sin limitaciones nutricionales, dado que Reb1 actuaría como un factor que previene el inicio de la fase S tras la mitosis. La misma explicación se aplica al hecho de que las células *ste9Δ* son perfectamente viables (Kitamura et al., 1998).

En la presente tesis hemos comprobado que la proteína Reb1 se hace necesaria para mantener la viabilidad celular bajo condiciones en las que se requiere de una fase G1 más larga para que la célula alcance el tamaño adecuado crítico para el inicio de la fase S. Los resultados presentes en la figura 10 muestran como al igual que sucede con el mutante doble de *ste9Δ wee1-50* (Kitamura et al., 1998; Yamaguchi et al., 1997) los mutantes dobles *reb1Δ wee1-50* muestran letalidad sintética a temperatura restrictiva. La observación microscópica de las células *reb1Δ wee1-50* a temperatura restrictiva indican que después de tan solo tres divisiones las células cesan su proliferación. Estos resultados sugieren que las células deficientes en la proteína Wee1 son incapaces de compensar el pequeño tamaño celular durante G1 en ausencia de Reb1, lo que indica un papel crucial de Reb1 como regulador de G1, no sólo bajo condiciones de estrés nutricional, sino también para evitar un paso prematuro del punto “start”, antes de que la célula haya alcanzado su tamaño crítico. Probablemente, la ausencia de Reb1 en estas condiciones provoca una mitosis prematura que conlleva muerte

DISCUSIÓN

celular. Esta función de Reb1 es ejercida a través de la regulación positiva de Ste9 ya que como se muestra en la figura 10 E la sobreexpresión de este activador de APC revierte el fenotipo de letalidad del doble mutante.

El requerimiento de Reb1 en la regulación de G1 en ausencia de estrés nutricional también se observó en el hecho de que los mutantes dobles de *reb1Δ cdc10-129* mostraran letalidad sintética ya a temperaturas semipermisivas (Figura 11). Estos resultados son consistentes con los resultados descritos anteriormente para *wee1*, e indican que en ausencia de Reb1, las células afectadas en su paso por “start”, probablemente por una baja expresión de los genes necesarios para la replicación del DNA a temperatura semipermisiva, continúan el ciclo y como consecuencia de que escapan de la parada en G1 y entran en replicación del DNA o en mitosis prematuramente, antes de que la célula haya cubierto los requerimientos para que la replicación y la mitosis puedan desarrollarse con normalidad presentan la consiguiente pérdida de viabilidad.

5.1.8.3. Reb1 participa en la regulación de la transición G2/M, regulando la expresión de la quinasa Nim1

En la transición G2/M la cascada de regulaciones por fosforilación iniciada por el gradiente de la proteína Pom1 (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009) controla que las células entren en mitosis con el tamaño adecuado. Cdr2 participa en la regulación negativa de Wee1 (Kano and Russell, 1998), y se encuentra en un nivel por debajo de Pom1 en la cascada de fosforilaciones siendo regulada de manera negativa por el gradiente de Pom1. La diana de Cdr2 es Nim1/Cdr1, que es otra serín-treonín quinasa, Cdr2 actúa como un activador de Nim1. La expresión de *nim1+* se requiere para una respuesta correcta al ayuno de nitrógeno (Feilotter et al., 1991) participa aguas arriba de la señalización Wee1 favoreciendo la entrada en mitosis de las células. Nim1 es un regulador negativo de Wee1, inactiva a esta proteína por fosforilación de manera que el complejo CDK se activa por la acción de la fosfatasa Cdc25 promoviendo la transición G2/M. Durante el ayuno de nitrógeno se produce una

DISCUSIÓN

sobreexpresión de *nim1+*. Las células que carecen de *nim1+* presentan una parada ineficiente en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno (Belenguer et al., 1997) que se asemeja mucho al fenotipo de las células *reb1Δ*. En la presente tesis doctoral hemos descubierto que la sobreexpresión de *nim1+* en respuesta al ayuno de nitrógeno es dependiente de la presencia de Reb1. Esta sobreexpresión posiblemente sirva para aumentar los niveles de proteína que permitan la entrada en mitosis de las células que se encontraban en G2 permitiendo la parada en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno. La proteína Nim1 es rápidamente degradada durante el ayuno, de esta manera se prevendría una nueva entrada en mitosis.

Las células *reb1Δ* tienen un tamaño ligeramente mayor al de las células wt (resultados no mostrados) esto podría deberse a que presentan unos niveles de expresión de *nim1+* inferiores a las células wt.

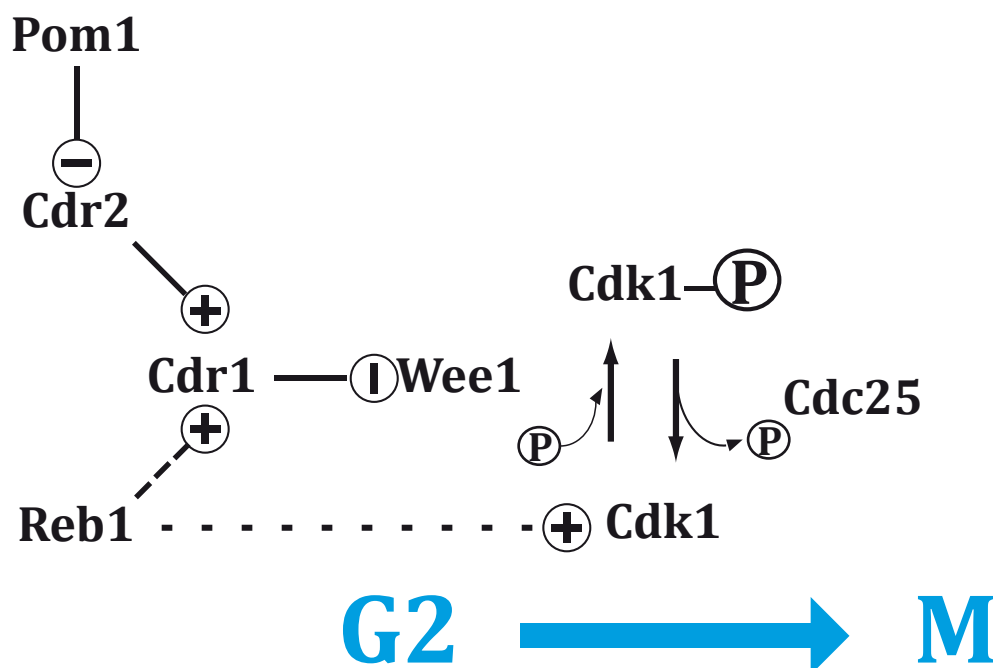


Figura 35: Reb1 participa en la transición G2/M durante el ayuno de nitrógeno. La sobreexpresión de Cdr1 inducida durante el ayuno de nitrógeno es dependiente de la presencia de la proteína Reb1.

DISCUSIÓN

5.2. La proteína Reb1 de *Schizosaccharomyces pombe* es necesaria para la supervivencia durante el estado de quiescencia derivado de la saturación en MM

5.2.1. Las células *reb1Δ* presentan un envejecimiento replicativo deficiente en MM

El envejecimiento es un proceso multifactorial en el que se produce un deterioro progresivo de los elementos celulares, que en última instancia, lleva a la muerte celular. Durante los últimos años se ha aumentado el uso de organismos que envejecen de manera rápida y cuya manipulación genética es sencilla, para el estudio del envejecimiento. En los organismos unicelulares como los hongos se ha descrito el proceso de envejecimiento de dos maneras:

- 1) **Envejecimiento replicativo** que es el número de generaciones (número de descendientes) que puede tener una célula. El concepto similar en mamíferos sería el límite de *Hayflick* que es el número máximo de divisiones que puede sufrir una célula. En *S. cerevisiae* por lo general la célula “madre” va acumulando elementos deletéreos que no transfiere a la célula “hija”, de manera que esta nace con su contador de divisiones reseteado a 0.
- 2) **Envejecimiento cronológico conocido como “*Chronological Life Span*” (CLS)** es el tiempo que permanece vivo un cultivo en fase estacionaria. Se considera que el envejecimiento cronológico se puede usar como modelo del envejecimiento de las células eucariotas ya que la mayoría de las células de los tejidos especializados se encuentran en estado de quiescencia (no replicativo) durante gran parte de la vida del individuo. Es importante sin embargo destacar que existe una gran diferencia entre las células en quiescencia de levaduras y las de los tejidos: mientras que en las primeras el metabolismo se ve reducido al mínimo para permitir la supervivencia de la célula, en los tejidos las células suelen encontrarse en su punto álgido de actividad metabólica y no se encuentran ayunando. En levaduras la supervivencia durante la fase estacionaria es una

DISCUSIÓN

adaptación evolutiva puesto que en su medio natural se encuentran sometidas a largos periodos de ausencia de nutrientes.

Una de las características fenotípicas del envejecimiento en *S. cerevisiae* es la aparición de círculos extracromosómicos de rDNA (también denominados ERCs, Extracromosomal rDNA circles, que se forman por recombinación homóloga entre copias de rDNA iniciada por la reparación de roturas de doble cadena) que se acumulan en las células madre debido a la segregación asimétrica de esta levadura y a que estos poseen secuencias de replicación autónoma (contienen el ARS del rDNA) pero carecen de secuencias centroméricas (Sinclair and Guarente, 1997). En *S. cerevisiae* solo la mitad de las copias del rDNA están activas en un determinado momento, el resto permanecen silenciadas gracias a la acción de la proteína Sir2. Esta proteína Sir2 junto con Sir3 y Sir4 también se encarga del silenciamiento de los telómeros y de los repositorios de información del locus del *mating type* (*HMR* y *HML*). En esta levadura el envejecimiento replicativo asimismo se ha visto asociado a la pérdida de fertilidad, y esta se ha correlacionado con una deficiencia en el silenciamiento del locus del *mating type*, que hace que se exprese a la vez la información de células de tipos α y de tipo α , y con la pérdida de silenciamiento en las regiones teloméricas. Se ha comprobado que las proteínas silenciadoras de la cromatina Sir2p y Hst2p ayudan a prolongar el potencial replicativo de las células reduciendo la acumulación de los círculos de rDNA. Otros componentes celulares que se distribuyen de manera asimétrica entre la célula “madre” y la “célula hija” que se han considerado como promotores del envejecimiento en las “madres” son las mitocondrias dañadas y proteínas con daño oxidativo.

En *S. cerevisiae* (como en otros organismos) se ha comprobado que la restricción calórica ayuda a potenciar la actividad replicativa de las células y la supervivencia cronológica. Se cree que la restricción en la toma de nutrientes actúa a través de la inhibición de varias rutas de protein-quinasa que actúan como mecanismos de señalización de nutrientes. Tanto la inhibición de la ruta de señalización TOR (que es una ruta sensible a la presencia de nitrógeno

DISCUSIÓN

en el medio y al contenido en carbono), como la inhibición de la ruta PKA (protein-quinasa A) como la inhibición de Sch9p (que es un homólogo de la quinasa AKT, que pertenece a la ruta de señalización tipo insulina) ayudan a potenciar la actividad replicativa de las células y la supervivencia cronológica. Parece que ambos mecanismos (restricción calórica o inhibición de quinasas de señalización de nutrientes) se basan en un mismo principio, reducir la actividad metabólica de las células. Aquellas células que presentan un metabolismo reducido tienen una longevidad mayor.

En *S. pombe* también se ha observado el envejecimiento replicativo (Barker and Walmsley, 1999), la división de las células de pombe al contrario de lo que puede parecer no es simétrica, se pueden observar diferencias entre las células madre y las células hijas. De manera que aunque el cultivo de células pueda ser inmortal, las células como individuos no lo son. Según se va dividiendo la célula “madre” va adquiriendo características morfológicas que la diferencian de las células hijas y al cabo de unas 15 divisiones las células madre mueren.

El proceso de envejecimiento cronológico en *S. pombe* está regulado por dos rutas de señalización de nutrientes (Roux et al., 2006). Una la que involucra a la Pka1 (una serín treonin quinasa activada por AMPc) y la otra ruta dependiente de los homólogos de AKT (y de SCH9 de *S. cerevisiae*) Sck2 y Sck1 que son también serín treonin quinasas. Cada uno de estos parálogos está involucrado en el mantenimiento del CLS bajo distintas condiciones siendo el *sck2+* el encargado de regular el CLS en condiciones normales y de sobrenutrición mientras que su parálogo *sck1+* solo lo controla en condiciones de sobrenutrición (Chen and Runge, 2009). Ambas rutas regulan procesos de crecimiento en respuesta a la presencia de nutrientes en el medio, parece que además regulan el proceso envejecimiento de manera independiente pero relacionada. Los mutantes de delección para cualquiera de estas dos proteínas quinasas presentan un CLS prolongado comparado con el WT, ambos mutantes fueron los primeros con esta característica (Roux et al., 2006) identificados en esta especie, la delección de *pka1* confiere a estos mutantes a su vez, una mayor resistencia a estrés oxidativo.

DISCUSIÓN

La inhibición de TORC1 por la adición de cafeína o rapamicina ayuda a prolongar el CLS en *S. pombe* (Rallis et al., 2013). Ambos compuestos estimulan una respuesta transcripcional que mimetiza al ayuno de nitrógeno. En *S. pombe* al contrario de lo que sucede en otros organismos la rapamicina no detiene el crecimiento de las células solo lo ralentiza. La cafeína dispara a ruta de SAPK (Stress activated protein kinases) e inhibe TORC1. Para que la rapamicina tenga efecto sobre el CLS de *S. pombe* durante la saturación, es necesario que este se adicione durante la entrada en saturación, debe de ser que la ruta solo está activa en ese momento, no durante la quiescencia.

5.2.1. Al contrario de lo que sucede con la delección de uno de sus homólogos en S. cerevisiae (fob1) la delección de reb1 genera una rápida pérdida de viabilidad en S. pombe

Debido a la naturaleza repetitiva del rDNA, este está sujeto a fenómenos de recombinación que pueden dar lugar a la formación de ERCs (círculos extracromosómicos) que son la principal causa de envejecimiento en *cerevisiae*, estos se acumulan en la célula madre llegando a ser tóxicos. Las células han desarrollado mecanismos para evitar esta recombinación, entre ellos se haya el el silenciamiento del DNA. En *S. cerevisiae*, Fob1 es la proteína encargada de generar las barreras de las horquillas replicativas en el rDNA. En esta levadura la delección del gen *fob1* aumenta la longevidad replicativa de las células hasta en un 70% (Defossez et al., 1999). La delección de *fob1+* reduce la actividad recombinatoria en el rDNA reduciendo la acumulación de círculos extracromosómicos lo que ayuda a prolongar la vida de estas levaduras.

En la introducción se mencionó como la proteína Nsi1p, que es otro ortólogo de Reb1, actúa como terminador de la transcripción por la RNA polimerasa I. Esta proteína a su vez interacciona con los factores de silenciamiento del rDNA. En la levadura de gemación el complejo multiproteico RENT se encarga de reprimir la transcripción de rDNA dependiente de la RNA polimerasa II. A este complejo pertenecen Sir2p (que es una proteína histona desacetilasa) que es necesaria para que se expanda el silenciamiento a través del rDNA, este

DISCUSIÓN

silenciamiento contribuye a la longevidad de las células evitando la actividad recombinogénica en la región, además Sir2p contribuye al silenciamiento de otras regiones del genoma como las regiones teloméricas. Otra proteína perteneciente al complejo RENT es Net1, ésta se encarga de reclutar Sir2 al rDNA, se une a la RNA Polimerasa I y regula la estructura del nucleolo. Tanto Net1 como Sir2 se encuentran asociadas a dos regiones del rDNA una en el NTS1 y otra en el NTS2 en el promotor de la RNA polimerasa I. Fob1 interacciona tanto con Net1 como con Sir2, reclutándolas al NTS1. Se ha comprobado que Nsi1 interacciona con todos estos componentes del complejo RENT. Parece que la actividad silenciadora de Nsi1 se restringe a la región del rDNA. Las interacciones Net1-Sir2 y Fob1-Net1 ocurren de manera independiente a la presencia de Nsi1 mientras que la interacción de Sir2-Net1 requiere en gran medida de la presencia de Fob1. Nsi1 parece actuar como un adaptador para Sir2.

Nsi1 contribuye a la longevidad de las células. La pérdida de Nsi1 hace que se reduzca la asociación de Sir2 al NTS1 incrementando la acetilación de las histonas de esa región, disminuyendo la estabilidad del rDNA y aumenta el número de ERCs con la consecuente reducción de la viabilidad de las células.

Como se comenta en el *apartado 4.1.5*, los cultivos de *S. pombe* que entran en saturación en MM presentan una senescencia clonal muy temprana. Tras tan solo 48h de permanencia en fase estacionaria comienza la aparición de células anucleadas, cuando estos cultivos se intentan volver a crecer en medio fresco son incapaces de reentrar en ciclo proliferativo y mueren. El estudio mediante la tinción vital Floxina B nos demuestra que estas células han perdido su capacidad de expulsar la floxina B de su interior por lo que no solo hay un porcentaje alto de células anucleadas sino que además las que no han perdido el núcleo parecen metabólicamente inactivas. **La delección de Reb1 no ha mostrado una aparición de ERCs en *S. pombe*. Los mecanismos por los que las células que carecen de Reb1 pierden su viabilidad durante la saturación en MM quedan por ser descubiertos.**

DISCUSIÓN

*5.2.2. La pérdida de la viabilidad durante el CLS de células *reb1Δ* podría deberse a defectos en la respiración o mecanismos de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno*

Como ya mencionamos previamente una de las principales causas de envejecimiento cronológico es la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Fallos en distintos puntos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (la mayor fuente de ROS intracelulares) conllevan la acumulación de ROS y a la disminución de la longevidad cronológica de las células.

S. cerevisiae sufre represión de la respiración mediada por glucosa durante la fase exponencial y es al final de esta fase, en el momento en que la glucosa se agota, cuando esta levadura empieza a respirar el etanol generado durante la fermentación. Se ha observado (Zuin et al., 2008) que las células de *S. pombe* también respiran durante la fase exponencial, y que la tasa de respiración depende del medio en el que crecen las células, siendo mayor en MM que en YES.

Como mencionamos en el apartado de resultados las células *reb1Δ* crecen peor en MM que en YES y además muestran un envejecimiento cronológico muy prematuro. Cuando se realizan ensayos de CLS en MM (donde la tasa respiratoria es muy elevada) con células *reb1Δ*, se observa estas que pierden viabilidad muy rápidamente. Además como también se mostró en la figura 21 A en YES las células *reb1Δ* son más resistentes a la adición extracelular de ROS crecen casi como el WT en concentraciones de 1 mM de H₂O₂ mientras que en MM solo conseguimos crecimiento a concentraciones por debajo de 0,5 mM. Cuando forzamos aún más la respiración, creciendo las células en MM con una fuente de carbono no fermentable, la viabilidad de los mutantes que carecen de Reb1 se ve altamente comprometida, esta pérdida de viabilidad se acrecienta por la adición de agentes oxidantes externos. Ya se describió que

DISCUSIÓN

un aumento de la acumulación de ROS lleva como última instancia a la disminución de la longevidad cronológica de estos organismos aeróbicos (Roux et al., 2006).

Una hipótesis que quedaría por comprobar es que las células *reb1Δ* serían deficientes en la respiración o en el mecanismo de detoxificación del estrés oxidativo, esto generaría una acumulación intracelular de ROS que cuando las células crecen en YES (acumulación subletal) les confiere resistencia adaptativa frente a otros tipos de estrés, sin embargo en MM en el que las células se ven forzadas a incrementar su tasa respiratoria, la acumulación intracelular de ROS es lo suficientemente alta como para producir efectos deletéreos en las células. A este respecto se plantea la posibilidad de realizar unos ensayos con diclorofluoresceína que es un marcador fluorescente que permite cuantificar los ROS intracelulares mediante FACS, se podría hacer una comparación entre estirpes wt y *reb1Δ* en los distintos medios.

Si analizamos los posibles genes involucrados en este proceso que podrían estar regulados por Reb1 observamos en la tabla 4, de categorización funcional de los picos, como 16 de los sitios donde hemos observado unión de Reb1 se encuentran en los promotores de genes involucrados en respuesta a estrés celular. Uno de estos es el gen *pgr1* que codifica para una Glutación-reductasa mitocondrial que participa en la homeostasis redox y en la respuesta al estrés oxidativo. También cabe destacar que hay 2 genes (*gcs1* y SPBC26H8.12) que fueron identificados como participantes en la respuesta al estrés oxidativo en (Zuin et al., 2008) que presentan un pico en una localización en 3' del TTS. *gcs1* codifica para una glutamato-cisteína ligasa mitocondrial, el pico de unión a Reb1 se encuentra a menos de 200 pb del TTS (se trata del pico del promotor de *res2*). El gen SPBC26H8.12 codifica para una posible citocromo-C hemoliasa, el pico de unión de Reb1 en este caso se encuentra algo más alejado del TTS a unas 2,4 Kb (pero por los resultados preliminares del estudio de microarrays parece que Reb1 podría estar regulando la expresión de su RNA antisense). Ambos genes son mitocondriales y son necesarios para la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo, tanto intrínseco

DISCUSIÓN

(cuando crecen en MM que promueve la respiración de las células) como extrínseco (cuando se añade peróxido de hidrógeno al medio). También es conocido que un componente de muchos sistemas de detoxificación y de reparación de daño oxidativo es el NADPH, la principal fuente citosólica de NADPH es la ruta de las pentosas fosfato. De nuevo observamos como en la tabla 4 aparecen varios genes asociados a la ruta de las pentosas fosfato que presentan pico de Reb1-TAP en su región promotora, entre ellos se encuentran el gen *fbp1* (cuya expresión vimos que al menos en algunos puntos durante el ayuno de nitrógeno está regulada por Reb1 figura 31) y los genes SPCC794.01c (una glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) y el gen SPBC660,16 (fosfogluconato deshidrogenasa).

Se ha descrito (Zuin et al., 2008) que algunos mutantes para genes mitocondriales en los que se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno el CLS de estos está muy comprometido. En este mismo artículo se describe como los estos mutantes alcanzan siempre menores densidades celulares que las células silvestres, un fenotipo que no hemos mostrado es el de que las células de *S. pombe* que carecen de *reb1* muestran siempre densidades celulares menores a las de las células wt (esto se puede observar en la figura 33 en la que se muestra la entrada en fase exponencial de dos cultivos uno wt y otro de células *reb1Δ*). Se cree que el motivo de que las células no alcancen estas densidades al llegar a saturación es que utilizan de manera ineficiente la glucosa del medio.

En *S. cerevisiae* se ha observado que en respuesta al estrés oxidativo se inhibe la actividad de varias enzimas glicolíticas (incluyendo a GAPDH) para canalizar el flujo del carbono hacia la ruta de las pentosas fosfato para generar NADPH que genera el poder reductor que necesitan la mayoría de las enzimas antioxidantes (Ralser et al., 2007) como observamos en la tabla 4, de clasificación funcional de los genes con pico Reb1-TAP, varios genes de ambas rutas (glucolisis y metabolismo de las pentosas fosfato) presentan picos de unión de Reb1-TAP, por lo que tal vez Reb1 participe en la regulación de esta respuesta. En *S. cerevisiae* también se ha visto grupo de genes que participan en la respuesta general a estrés se regula principalmente

DISCUSIÓN

por los factores transcripcionales Msn2p/ Msn4p cuyo homólogo en pombe es *hsr1* este gen presenta un motivo FIMO de unión de Reb1 en las proximidades de su codón de inicio de traducción (en los microarray s hemos visto que en ausencia de Reb1 la expresión de este gen es mayor en el mutante *reb1Δ*).

El envejecimiento prematuro de las células que carecen de Reb1 durante la fase estacionaria en MM podría ser consecuencia de un defecto en la respiración de estas células que cause un incremento de ROS que conlleva a una prematura senescencia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La proteína Reb1 presenta varias isoformas que son dependientes del medio en el que crecen las células.
 - a. Estas isoformas se deben a un procesamiento postraducciona del extremo amino terminal de la proteína.
 - b. Durante el ayuno de nitrógeno Reb1 es procesada hacia las isoformas de menor tamaño.
2. Reb1 interacciona con otras proteínas formando complejos multiproteicos en el promotor de *ste9+*.
 - a. Al menos tres de estos complejos se pueden explicar por la polimerización de la propia proteína Reb1, dos de los complejos parecen ser dependientes de la presencia de proteínas aún no identificadas.
 - b. El procesamiento de la proteína Reb1 en su extremo amino terminal (donde se encuentra el dominio de dimerización) genera la pérdida de casi todos los complejos de Reb1 y el promotor de *ste9+*.
3. Reb1 se une a varios sitios en el genoma de *S. pombe*.
 - a. Existen 3 sitios de unión de Reb1 en la región del rDNA. Dos en las RFBs (2 y 3) y un tercero en el origen de replicación ars3001.
 - i. La unión de Reb1 a estos tres sitios genera barreras para las horquillas replicativas que avanzan en sentido contrario a la transcripción de los genes del rDNA.
 - b. Reb1 se une a secuencias reguladoras de genes
 - i. Se une preferentemente a la región promotora en las proximidades del TSS y en una orientación tal que bloquea las horquillas que avanzan en favor de la transcripción del gen.
 - ii. La unión de Reb1 a algunos de estos promotores genera barreras para las horquillas replicativas.

CONCLUSIONES

- c. Reb1 regula la expresión dependiente de ayuno de nitrógeno de algunos de los genes a cuyo promotor se une.
- 4. Reb1 participa en la regulación de la fase G1 del ciclo celular bajo condiciones de ayuno de nitrógeno.
- 5. La proteína Reb1 participa en las transiciones G1/S y G2/M por medio de la regulación de la expresión de genes necesarios para ambos pasos.
- 6. En ausencia de la proteína Reb1 las células pierden rápidamente su viabilidad durante la fase estacionaria en medio mínimo.

7.1. Material biológico: cepas y plásmidos

7.1.1. Cepas de *S. pombe*

Las cepas de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas en la presente tesis doctoral han sido las siguientes:

Nombre	Genotipo
MR001	h90 reb1::KanMX6
MR002	h+ reb1::KanMX6
MR003	h- reb1 ::KanMX6 ura4-D18
MR004	h+ reb1 ::KanMX6 ura4-D18
MR005	h+ cdc25-22
MR006	h- reb1::KanMX6 cdc25-22
MR007	h+ reb1::KanMX6 cdc25-22
MR008	h- reb1 ::KanMX6 wee1-50 ura4-294
MR009	h+ reb1 ::KanMX6 wee1-50 ura4-294
MR010	h- mutPste9 cdc25-22
MR011	h- wee1-50
MR012	h+ wee1-50
MR013	h- reb1MetArg::CysGlu
MR014	h- reb1 ::KanMX6 wee1-50
MR015	h+ reb1 ::KanMX6 wee1-50
MR016	h- mutPste9 wee1-50
MR017	h+ mutPste9 wee1-50
MR018	h- reb1 ::KanMX6 cdc10-129 (Auxotrófa)
MR019	h+ reb1 ::KanMX6 cdc10-129 (Auxotrófa)
MR020	h- reb1-3HA HygMX6
MR021	h- leu1-32
MR022	h+ leu1-32
MR023	h- reb1 ::KanMX6 leu132 wee1-50
MR024	h+ reb1 ::KanMX6 leu132 wee1-50
MR025	h- reb1 ::KanMX6 leu132
MR026	h+ reb1 ::KanMX6 leu132

MATERIALES Y MÉTODOS

MR027	h+	cdc10-129
MR028	h-	cdc10-129 mutPste9
MR029	h+	cdc10-129 mutPste9
MR030	h-	cdc10-129 con auxotrofias
MR031	h-	leu132 swi1::KanMX6
MR032	h+	leu132 swi1::KanMX6
MR033	h-	cdc10-129
MR034	h+	cdc10-129
MR035	h-	cdc10-129 reb1::kanMX6
MR036	h+	cdc10-129 reb1::kanMX6
MR037	h-	swi1::kanMX6
MR038	h+	swi1::kanMX6
MR042	h+	cdc25-22 reb1-13MYC:natMX6
MR043	h-	cdc25-22 reb1-13MYC:natMX6
MR044	h+	cdc10-129 reb1-13MYC:natMX6
MR045	h-	cdc10-129 reb1-13MYC:natMX6
MR046	h-	wee1-50 reb1-13MYC:natMX6
MR047	h+	wee1-50 reb1-13MYC:natMX6
MR048	h+	reb1-13MYC:natMX6

Tabla 8. Estirpes de *Schizosaccharomyces pombe* generadas durante la presente tesis doctoral.

Nombre	Genotipo	Procedencia
972	h-	Dr. Juan Jimenez
968	h90	YGRC: Yeast Genetic Resource Center
975	h+	YGRC
FY16193	h+ wee1-50 ura4-294	YGRC
S1335	h- ura4-d18	Dr. Sergio Moreno
118	h- leu1-132 ura4-d18 ade6-M216	Dr. Sergio Moreno
ZG001	h90 reb1-3HA:HygMX6	Stock del Laboratorio
ZG059	h- reb1-13MYC	Stock del Laboratorio
D9P	h- reb1::KanMX6	Stock del Laboratorio
LR3	h-	Stock del Laboratorio

MATERIALES Y MÉTODOS

LR4P

h-

Pste9mut

Stock del Laboratorio

Tabla 9. Otras estirpes de *Schizosaccharomyces pombe* utilizadas durante la presente tesis doctoral.

7.1.2. Cepas de *E. coli*

Las estirpe de *Escherichia coli* empleadas han sido:

DH5 α F': [F'/*endA1*, *hsdR17*(_{r_K-m_K}+), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA*, (Na¹'), *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)_{u169}, (*m80lacZ* Δ M15)]

Top10: [F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *recA1*, *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK*rpsL (StrR) *endA1 nupG*].

7.1.3. Plásmidos

A continuación se detalla el listado de plásmidos empleados en la presente tesis doctoral.

Nombre	características
pREP42X	Vector vacío, contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pREP42X-IsoA(HA)	Expresión de isoforma A de Reb1-HA, en <i>S. pombe</i> . Contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pREP42X-IsoB(HA)	Expresión de isoforma B de Reb1-HA, en <i>S. pombe</i> . Contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pREP42X-IsoC(HA)	Expresión de isoforma C de Reb1-HA, en <i>S. pombe</i> . Contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pREP81X	vector vacío. Contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pREP81X-ste9	Vector para la expresión de <i>ste9</i> en <i>S. pombe</i> . Contiene un promotor para la expresión de proteínas que es reprimido por tiamina.
pBAD24	Vector vacío. Promotor inducible por arabinosa.
pBAD24-Reb1	Usado para la expresión de 6xHisReb1 en <i>E. coli</i> .
pIRT2-118-Ste9	Para generar la sonda de EMSA <i>ste9</i> .

MATERIALES Y MÉTODOS

Nombre	características
pGEM-T-easy	Vector para clonaje intermedio mediante técnica de clonaje T/A.
pSte9(+)	plásmido que contiene la secuencia de unión de Reb1 al promotor de <i>ste9+</i> en la orientación de parada de horquillas replicativas.
pSte9(-)	plásmido que contiene la secuencia de unión de Reb1 al promotor de <i>ste9+</i> en la orientación contraria al plásmido pSte9(+).

Tabla 10. Listado de plásmidos utilizados.

7.1.4. Construcción de plásmidos para la expresión de las distintas isoformas de Reb1-HA

Se procedió al clonaje de las posibles isoformas de *reb1-HA* en vectores de expresión, pREP42X, con el promotor nmt. reprimibles por tiamina.

Mediante una PCR con una polimerasa de alta fidelidad: Phusion Hot-Start High-Fidelity DNA polymerase de Finnzymes) se obtuvieron los fragmentos correspondientes a cada una de las 3 isoformas A, B y C, esta se realizó sobre el DNA la estirpe ZG001 ya que contiene la secuencia de un epítipo (3HA) en el extremo C-ter de la secuencia codificante de Reb1. Para el clonaje en todos los casos se utilizó el mismo cebador en 3' (Iso Rv) y distintos cebadores en 5' dependiendo de la isoforma que se deseaba clonar, las secuencias de los mismos se muestran

en el siguiente listado:

MR16 IsoAFw	CCCCTCGAGATG GAT ACC TCC GTA TTA AAT C
MR17 IsoBFw	CCCCTCGAGATG AGA AAC TCT ACT TCG AAT C
MR18 IsoCFw	CCCCTCGAGATG TTT TGC AAT CAA ATT TGG G
MR19 Iso Rv	CCCCTCGAGTCA GCA CTG AGC AGC GTA ATC T

7.1.5. Construcción de plásmidos para la expresión de Reb1 en E. coli

Se clonó la secuencia del cDNA del gen *reb1+*, introduciéndole 6 histidinas en el extremo amino terminal, en el vector pBAD-24, inducible por arabinosa, por medio de una retrotranscripción de RNA de una estirpe silvestre (wt 972) (utilizando oligo-dT para la producción del cDNA) seguida de PCR con los siguientes cebadores:

MATERIALES Y MÉTODOS

MR12	3'EcoReb	CCCGAATTCTCAATTGGAGAATCCAGAAAGTACCACTTTAAAGTCATCAATG GCTGACTTCGTGGCTTC
MR13	5'ecohisreb	cccgaattcATGCATcatCATcatCATcatGATACCTCCGTATTAAATCCGGAACCTT CAGATTCATGGATT

7.2. Medios de cultivo

7.2.1. Medios de cultivo de *S. pombe*

Medio YES: Extracto de levadura al 0.5%, 3% de glucosa, y una mezcla de los siguientes aminoácidos a 250 mg/l de cada uno: adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina, con un pH 5.6.

Medio mínimo (MM): preparado según la receta de Moreno y col, 1991. Este medio se suplementó en los casos necesarios con los aminoácidos: adenina (ade) 0.47 g/l, uracilo (ura) 0.23 g/l y 0.47 g/l de leucina (leu).

Para realizar los ayunos de nitrógeno el medio se preparó de igual manera pero sin adicionar el cloruro amónico (MM-N₂).

Medio FOA: para la selección de estirpes *ura*-, agar 2%, ácido fluorótico monohidrato 0.1%, 0.007% de YNB (Yeast Nitrogen Base) y 2% de dextrosa, 0.05 mg/ml de uracilo, 0.225 mg/ml adenina, 0.225 mg/ml leucina y 0.225 mg/ml de histidina.

Medio MAE: para favorecer la conjugación de estirpes se crecieron a 25 °C en extracto de malta 3%, agar 2% suplementado con una mezcla de histidina, leucina, adenina y uracilo a 75 mg/l cada uno.

Los medios sólidos se prepararon con agar al 2%.

Salvo cuando se indique de otra manera como fuente de carbono se utilizó glucosa al 2% en el MM y al 3% en YES.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la selección de estirpes transformadas con cassettes de resistencia a antibióticos se procedió como en (Hentges et al., 2005; Sato et al., 2005; Van Driessche et al., 2005).

Para reprimir el promotor nmt1 se añadió tiamina 15 μ M al medio mínimo.

7.3. Medios de cultivo bacterianos

El medio de cultivo empleado para crecer *E.coli* fue LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y cloruro de sodio 1%) líquido o sólido (agar 2%).

Para la selección de la resistencia a ampicilina se empleó una concentración de 75 μ g/ml de ampicilina.

La selección de bacterias transformadas con los vectores recombinantes por medio de método de selección por color (vector pGEM-T easy de invitrogen) se hizo adicionando a las placas IPTG 0.5 mM y X-gal 80 μ g/ml.

7.4. Condiciones de cultivo

7.4.1. Cultivo de *S. pombe*

El cultivo rutinario en medio líquido de *S. pombe* se realizó a 30°C con una agitación de 250 rpm.

Para la realización de los ayunos las células crecidas hasta fase exponencial (OD₅₉₅ = 0,5) a 30°C, se lavaron 3 veces en un volumen de MM -N, y se resuspendieron en el mismo volumen de MM-N. Los ayunos de nitrógeno se realizaron a 25°C.

El resto de condiciones experimentales están indicadas en el texto.

7.5. Técnicas experimentales

7.5.1. Transformación celular

7.5.1.1. Transformación de *S.pombe*

Para transformar las estirpes de *S.pombe* se empleó el método del Acetato de Litio (Bahler, Wu et al. 1998).

7.5.2. Transformación de *E.coli*

Para transformar a las células DH5 α F' se siguió el procedimiento del choque térmico. Se creció el cultivo durante 16 h a 37 °C en LB, se diluyó el cultivo 100 veces en LB + 10 mM de MgSO₄, y se dejó crecer a 37°C hasta una OD₆₀₀=0.3. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1ml (una por transformación) y se centrifugaron 5 minutos a 3000rpm. Los *pellets* se resuspendieron en 100 μ l de CaCl₂ 0.1 M frío. Se incubaron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se añadieron 10 ng del DNA con el que se iba a transformar y se incubaron en hielo durante 10 minutos. : Para el choque térmico se incubaron las células 2 minutos a 42°C y de inmediato a se pasaron a hielo. Para la expresión del fenotipo se añadió 1 ml de LB y se incubaron, las bacterias, 1 hora a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm y se resuspendieron en 100 μ l de LB. Las células se sembraron en medio sólido con el antibiótico de selección: Ampicilina 75 μ g/ml.

7.5.3. FACS, análisis de muestras mediante citometría de flujo

Para el análisis mediante citometría de flujo se tomaron alícuotas de 10⁷ células que tras un lavado con 1 ml dH₂O se fijaron en 1 ml de etanol al 70% frío. Estas muestras se guardaron a 4°C hasta su posterior uso.

Se tomaron 100 μ l de la muestra fijada y se lavaron 2 veces con tampón citrato sódico 50mM para su rehidratación. Se resuspendieron las muestras en 250 μ l de tampón citrato sódico 50mM con 200 μ g/ml de RNasa A y se incubaron a 37°C 2 horas. Tras este tratamiento se

MATERIALES Y MÉTODOS

añadió un volumen (250 µl) de tampón citrato sódico 50mM con 2 µM de SYTOX[®] green, quedando este a una concentración final de 1µM. Las muestras se sonicaron durante 10 segundos a una potencia 35% y se analizaron en el servicio de citometría de flujo del CIB. El citómetro utilizado fue un Beckman Coulter EPICS XL-MCLc.

7.5.4. Extracción de DNA de *S. pombe*

7.5.4.1. Extracción para PFGE

Se recogieron 2.5×10^8 células, se centrifugaron 5 minutos a 2000 g y se lavaron con 20 ml de tampón CSE (20 mM ácido cítrico, 20 mM Na₂HPO₄, sorbitol 1.2 M y EDTA 40 mM). Se volvieron a centrifugar y se congelaron a -20°C hasta su uso. Se descongelaron las células en hielo y se resuspendieron en 200 µl de CSE, se mezclaron con otros 200 µl de agarosa (de bajo punto de fusión) preparada al 1% en CSE (quedan a una concentración de unas 4×10^8 células /ml). Se añadieron las células en los moldes y se dejó que la agarosa gelificase a 4°C. La digestión de la pared celular se realizó dentro de los tacos de agarosa, incubandose estos en una solución de CSE + 1 mg/ml de Zimoliasa 20T durante 2 horas a 37°C y en agitación. La lisis celular se realizó a 55°C en agitación en tampón NDS (10 mM tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% lauril sarcosil a pH 9.5) con proteinasa K a una concentración de 1 mg/ml, durante 48 horas (a las 24h de la primera incubación se cambia la solución y se deja otras 24 h).

Una vez digeridas las paredes y lisadas las células se equilibran en tampón Tris-EDTA a pH 7.5.

Los tacos que se utilizaron para ver cromosomas intactos no sufrieron procesamiento posterior.

Para comprobar el número de copias de rDNA, se procedió a una digestión con PvuII, para ello se trataron los tacos dos veces con solución con PMSF 1 mM en 10 mM Tris-HCl y 1 mM EDTA pH 7.6 (1 hora cada vez) para inactivar las posibles proteasas. Posteriormente se incubaron en el tampón de digestión 2 veces durante media hora a temperatura ambiente. En la segunda

MATERIALES Y MÉTODOS

incubación se añadió RNAsa A a 200 µg/ml. La digestión se llevó a cabo con la enzima PvuII-HF de New England Biolabs a una concentración de 125 U/ taco durante 4 horas a 37 °C. Tras esta primera incubación se realizó una segunda incubación en una nueva solución de digestión con la misma concentración de enzima durante otras 2 horas.

Antes de cargar los tacos en el gel se equilibraron 2 veces durante 15 minutos en el tampón de electroforesis del gel.

A continuación se detallan las condiciones de electroforesis de campo pulsado.

	cromosomas intactos	cromosomas digeridos con PvuII
% de Agarosa SeaKem Lee	0,8	1
Tampón del gel	TAE 1X	TBE 0,5 X
Tampón de electroforesis	TAE 1X	TBE 0,5 X
Temperatura	14 °C	14 °C
Tiempo	72 horas	22 horas
Voltaje	2 Voltios/ cm	6 Voltios/ cm
Tiempo de <i>Switching</i> inicial	1800 segundos	50 segundos
Tiempo de <i>Switching</i> final	1800 segundos	90 segundos
Ángulo de electroforesis	106 °	120 °

Tabla 11. Condiciones de electroforesis de campo pulsado (PFGE), para ver cromosomas intactos y digeridos con PvuII de *S. pombe*.

7.5.5. Extracción de DNA para geles bidimensionales

La extracción de intermediarios de replicación se realizó como en (Sánchez-Gorostiaga et al., 2004).

7.5.6. Extracción de RNA de *S. pombe*

Se utilizó el protocolo sugerido en el kit de extracción de RNA de QIAGEN, RNeasy kit. La eliminación de los residuos de DNA para la generación de cDNA, se realizó mediante un

MATERIALES Y MÉTODOS

tratamiento con DNAsa también de QIAgen durante el protocolo de extracción, como indica el protocolo.

7.5.6.1. RT-qPCR

Para la realización de las RT-qPCRs (retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real) el RNA se retrotranscribió a cDNA utilizando la enzima Superscript II de Invitrogen y oligo-dT como cebador puesto que solo nos interesaba el estudio de los RNAs codificantes. Las PCRs cuantitativas (qPCRs) se realizaron en una máquina IQ5 de BioRad usando SYBER-Green y el análisis de los datos se hizo mediante el método de la $\Delta\Delta C_t$ (Livak and Schmittgen, 2001; Schmittgen and Livak, 2008).

A continuación se describen los oligos empleados para la amplificación de los genes estudiados:

<i>urg1</i>	MR33	CCCACTTTTGACTTCCCTGA
	MR121	AAGACGCTAGGGTAAGATGG
<i>ste9</i>	MR122	GCTGAACCCACCTGAGTGAT
	MR123	TGCTTTGGCTTCTCGAGTTT
<i>nim1</i>	MR116	ATTAGGATGGCGCAACAAAC
	MR117	TGCCAAGCATGCTAAACTG
<i>kes1</i>	MR86	ATCCAAGGCAACTGCAAAGT
	MR115	TGCGGTAACTATAAGCCTGTCA
<i>pgk1</i>	MR112	ATCGACACCGACCATAGAGG
	MR114	CGAGGCTTTCCGTAAGTCTTT
<i>cdc2</i>	MR146	TCCATTATTTCCCGGTGACT
	MR147	CGTGACTCCAGGCCATACTT
<i>cdc18</i>	MR148	CTCCTAAAACCCCAAAAAGG
	MR149	GATTGCAAAAGGCGAGTAGC

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>cig2</i>	MR154	GCCACGTCGAACTGTCCTAT
	MR155	TCGAACGATCTTTTCGCTTT
<i>ste11</i>	MR160	GCTGGAAAATCCCGAATACA
	MR161	CCACAAAAGATCCGGAAGAA
<i>fbp1</i>	MR163	CATTGGTTTATCGGGAATCG
	MR164	CGTTCGACTTCATCGCAGTA
<i>cgs1</i>	MR165	CAGTGAGAAATGCGACGGTA
	MR166	AAATCGATCGCGTTACCAAG

Tabla 12. Parejas de oligos utilizados para la realización de las PCRs cuantitativas para el análisis de expresión génica.

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas se comprobaron mediante el test de Shapiro-Wilk y test de la F de Levene, respectivamente. Para comprobar las diferencias existentes entre las medias de las variables estudiadas se realizó un análisis mediante t-Student. El nivel de significación fue $\alpha = 0.05$ (*) [se consideraron como significativos * valores de $p < 0.05$, altamente significativos (**) valores de $p < 0.01$ y muy altamente significativos (***) valores de $p < 0.001$]. Se recurrió al test no-paramétrico de *Kruskal-Wallis* cuando los datos no cumplían los requisitos de normalidad. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico IBM SPSS 19 (2011).

7.5.6.2. Northern-blot

Para los ensayos de Northern-blot se utilizó el mismo método de extracción que para los ensayos de RT-qPCR.

Los geles de Northern-blot se prepararon en agarosa SeaKem Lee al 1,2% en tampón MOPS 1x (MOPS 10 X = 200 mM MOPS, Acetato sódico 50 mM, EDTA 10mM y pH7) con formaldehído a una concentración final del 8% y 0.5 μg /ml de bromuro de etidio. Antes de cargar el RNA este

MATERIALES Y MÉTODOS

se desnaturalizó durante 10 minutos a 65°C en presencia de 50% formamida y 5,5 % de formaldehído. Se incubaron dos minutos en hielo y en el momento de carga se añadió el tampon de carga. Las muestras se corrieron a 150 V durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.

La transferencia neutra del RNA a las membranas de nailon (Zeta Probe GT Blotting Membranes, BioRad) se hizo en presencia de 10 x SSC (SSC 20X = 3M NaCl y 300 mM citrato sódico). El RNA se fijó a las membranas mediante unión covalente por medio de irradiación ultravioleta con usando un stratalinker 1800 (de stratagene) en modo autocroslink.

7.5.6.3. Extracción de RNA para microarrays de expresión

Para la obtención del RNA para el ensayo de microarrays de expresión se usaron 50 ml de cultivo de células en crecimiento exponencial (crecidas en MM o crecidas en MM-N durante 0.5 h y 1h). Las células se recogieron mediante centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm y 4°C y se congelaron de inmediato por inmersión en nieve carbónica y etanol. Se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

Para la extracción del RNA se descongelaron en hielo y se lavaron con 1 ml de agua a 4°C. Se centrifugaron 10 segundos a 5000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 750 µl de TES y se añadieron 750 µl de fenol-cloroformo ácido. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 65°C (cada 10 minutos se agitaban durante 10 segundos en el vortex). Tras ese tiempo se colocaron en hielo durante un minuto y se centrifugaron 15 minutos a 20000 g a 4°C. La fase acuosa se añadió sobre columnas MaxTract High density de QIAGEN a las que previamente les habíamos añadido 700 µl de fenol-cloroformo ácido. Se mezcló bien por inversión y se centrifugaron durante 5 minutos a 20000 g a 4°C.

La fase acuosa se pasó a tubos nuevos de MaxTract High density a los que previamente les habíamos añadido 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico y se mezclaron bien por inversión. De nuevo se centrifugaron durante 5 minutos a 20000 g a 4°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La fase acuosa se precipitó y el RNA se volvió a purificar siguiendo el protocolo del kit RNeasy kit de QIAgen.

Para la realización de los microarrays el RNA se transformaron en cDNA 10 µg de RNA mediante una retrotranscripción con Superscript III con oligo dT y hexámeros al azar, en la que mientras se transformaba a cDNA se marcaron las muestras con dUTP con Alexa 555(verde) o Alexa 647 (rojo) .

El diseño del experimento se realizó marcando cada una de las muestras por separado en rojo y una mezcla de todas las muestras (que se usará como control de hibridación y background en todos los arrays)en verde.

Los restos de RNA se eliminaron con una incubación con 15 µl NaOH 0.1 M durante 30 minutos a 70°C y se neutralizó con 15 µl de 0.1M de HCl.

El cDNA se purificó con el kit de invitrogen Pure Link PCR system (K3100-06).

Los arrays empleados son unos arrays (de 4 x40K) de dos colores hechos por Agilent por encargo con secuencias específicas para el análisis del genoma de *S. pombe* (ID033946-20110427.GAL) y se siguió el protocolo de hibridación recomendado por la casa comercial.

El escaneo de los microarrays se realizó con un escaner Genepix de Molecular Devices, y tras el tratamiento de las imágenes se usaron los scripts normalizadores de microarray usados por rutina en el laboratorio del Dr Bähler.

El análisis de los resultados se realizó con el programa Genespring X de Agilent.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.5.7. Extracción de proteínas

7.5.7.1. Extracción de proteínas para ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Para la extracción de proteínas de *S. pombe* para realizar los ensayos de cambio de movilidad electroforética se usó un tampón de lisis compuesto por 25 mM HEPES pH7.6, 0.1 mM EDTA, 150 mM KCl, 0,1% triton, 1 M urea, glicerol al 25 %, una pastilla de Roche mini EDTA free protease inhibitor cocktail (por cada 10 ml de tampón) y PMSF 0,2 mM.

Brevemente, la extracción se realizó sobre 50 ml de cultivos de células crecidas hasta fase exponencial ($OD_{595}=0.5$), estos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavaron en un volumen de agua destilada. Los depósitos celulares se congelaron hasta su posterior uso a -80°C. La extracción se realizó en el buffer de lisis indicado mediante rotura mecánica por Fast-Prep-24 (de MP) mediante dos ciclos de 20 segundos a velocidad 5 m/s con un descanso de dos minutos entre ciclo y ciclo. El lisado celular se centrifugó durante 15 minutos a 14000 rpm y 4°C. Los sobrenadantes se guardaron en alícuotas de un solo uso y se congelaron a -20°C.

Para la extracción de la proteína recombinante 6his-Reb1 de *E. coli* se usó un tampón de lisis compuesto de KCl 1M pH 8, 50 mM imidazol, lisozima 0.03 mg/ml, Britj 8 al 1%, 1 mM PABA y 0.2 mM PMSF.

En resumen, cultivos (en presencia de glucosa) saturados de TOP10 transformada con los vectores de expresión pBAD24 y pBAD24-Reb1 se diluyeron 100 veces en 50 ml de LB (con 75 µg/ml de ampicilina y 0.2% de glucosa) y se dejaron crecer hasta fase exponencial ($OD_{600}=0.5$) momento en el que se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente y se lavaron dos veces en un volumen de LB con 75 µg/ml de ampicilina y 4×10^{-3} % de arabinosa, se resuspendieron en el mismo volumen (50 ml) de LB con 75 µg/ml de ampicilina y 4×10^{-3} % de arabinosa y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Las células se centrifugaron como se

MATERIALES Y MÉTODOS

ha indicado anteriormente y se lavaron con un volumen de agua destilada y se volvieron a centrifugar. Se guardaron las células a -20°C hasta su uso.

Para la extracción de proteínas, se descongelaron las células en hielo, se resuspendieron en 1,5 ml de tampón de lisis de *E. coli* y se sonicaron 3 veces durante 30 segundos con una intensidad del 60 %. Entre sonicación y sonicación se incubaron 3 minutos en hielo. Los lisados celulares se centrifugaron durante 2 horas a 4°C y 13000 rpm. El sobrenadante se alicuotó hasta su posterior uso a -20°C.

Para la realización de los EMSAs se emplearon por reacción 14 µg de proteínas totales de *E. coli* o 50 µg de proteínas totales de *S. pombe*. La cuantificación se hizo mediante un ensayo BCA de *pierce*. Los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizaron como en (Mejia-Ramirez et al., 2005).

7.5.7.2. Extracción de proteínas para los ensayos de fosfatasa lambda

Se utilizó el mismo protocolo que para la extracción de proteínas para el EMSA, con células ZG059 (Reb1-13myc).

Una vez extraídas las proteínas se trataron 500 µg de proteínas totales con 4000 unidades de fosfatasa lambda durante 30 minutos a 30°C (Esta reacción se hizo en presencia de 100 mM de ortovanadato sódico y 250 mM de fluoruro sódico como inhibidores de proteasas). Posteriormente se inactivó la reacción durante 30 minutos a 65°C y los extractos se procesaron en el servicio de proteómica del CIB. La electroforesis bidimensional se hizo en un gradiente de pH de 4 a 7.

7.5.7.3. Extracción de proteínas para western-blot

El procedimiento de extracción proteica fue el mismo que para los EMSAs, antes de usarse en las electroforesis 50 µg de proteínas se hirvieron en presencia de buffer de carga durante 5 minutos.

7.5.8. ChIP- seq

Cultivos de 1l de células en crecimiento exponencial a OD₅₉₅=1 se fijaron durante 30 minutos con formaldehído al 1%. La fijación se paró incubando con glicina 125 mM durante 10 minutos. Se centrifugaron 5 minutos a 2000 x g a 4°C. Alicuotas de 100 ml del cultivo inicial se lavaron con 40 ml de PBS frío y se volvieron a centrifugar. Tras eliminar bien el sobrenadante se congelaron rápidamente en un baño de nieve carbónica y etanol y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Las células se descongelaron en hielo y se resuspendió cada alicuota en 800 µl de tampón de lisis frío (50 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.1% doxicolato sódico, 1 pastilla de Roche mini EDTA free protease inhibitor cocktail (por cada 10 ml de tampón) y 1 mM de PMSF). Se repartió la suspensión de células en tubos de rosca a los que se añadieron *glass beads*. Las paredes celulares se rompieron mediante Fast-Prep-24 (de MP) a una velocidad de 4 m/s en ciclos de 20 segundos con descanso de dos minutos en hielo, hasta observar una rotura del 90% de las células aproximadamente. Los lisados se centrifugaron 1 minuto a 500 g a 4°C y se recogieron. Para aumentar el rendimiento se añadieron otros 400 µl de tampón de lisis a las glass beads y se volvieron a centrifugar de igual manera. Se mezclaron los filtrados de las glass beads y se centrifugaron 10 minutos a 20000g a 4°C, tras eliminar el sobrenadante los precipitados se lavaron 2 veces con 800 µl de buffer de lisis y se volvieron a centrifugar como arriba.

Los precipitados se resuspendieron en 750 µl de buffer de lisis frío, se juntaron todas las alícuotas de una muestra y se repartieron en alícuotas de 300 µl en tubos de Axigen.

La cromatina se sonicó 6 x 5 minutos en un Bioruptor (de Diagenode) con ciclos de 30 segundos On/ 30 segundos Off, en agua a 4°C. Una vez sonicada la cromatina se centrifugó 10 minutos a 2000 g a 4°C. El sobrenadante se alícuotó y se conservó a -80°C hasta su uso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se inmunoprecipitaron 5 mg de proteínas en 50 μ l de Dynabeads M-280 Sheep anti- Rabbit IgG 112.03 y 50 μ l de Dynabeads Pan Mouse IgG110.41 previamente bloqueadas en (tampón de lisis 0,5 % de BSA) durante 20 horas a 4°C, en una noria.

Tras la inmunoprecipitación se lavaron los inmunoprecipitados 2 veces con 1 ml cada una de las siguientes soluciones:

1. Tampón de lisis sin inhibidores (50 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.1% doxicolato sódico)
2. Tampón de lisis 500 (50 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.1% doxicolato sódico).
3. Tampón LiCL (10 mM tris HCl, 1 mM EDTA pH8, 250 mM LiCl, 1% NP-40 y 1% doxicolato sódico)
4. TE (10 mM TrisHCl, 1mM EDTA pH8).

Una vez realizados los lavados se resuspendieron las bolitas magnéticas en 200 μ l de tampón de separación (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH8 y 1% SDS) y se incubaron 18 h a 65°C (durante los primeros 45 minutos se agitaron en vortex 20 segundos cada 15 minutos). Se recogió el sobrenadante donde se encuentra el DNA y se trató con RNAsa (se añadieron 200 μ l de TE y 5 μ l de RNAsa DNAsa free de Roche, de 500 μ g/ml) se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se realizó un tratamiento con proteinasa K (7 μ l de proteinasa K a 20 mg/ml) durante 2 horas a 55°C. El DNA se purificó por medio de fenolizaciones y se precipitó en presencia de glicógeno para favorecer la precipitación.

Tras la cuantificación y comprobación de la calidad del DNA por medio de un chip de Agilent High sensitivity DNA kit , en el Bioanalyzer. Se procedió a la preparación de las muestras para su secuenciación siguiendo el protocolo recomendado por Illumina con los reactivos del TruSeq ChIP Sample Prep Kit y se mandaron a secuenciar al servicio de secuenciación del UCL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis de los datos se utilizó el programa CLC Genomics workbench 6, con los parámetros especificados en el texto. El genoma usado de referencia es el depositado en Pombase <http://www.pombase.org/downloads/datasets>

7.5.9.Otras técnicas

Se siguieron los protocolos indicados en el *Fission yeast handbook* http://biosci.osu.edu/~nile/nurse_lab_manual.pdf del laboratorio del Dr Paul Nurse y en (Forsburg, 2003, 2003; Forsburg and Rhind, 2006).

8.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Alfredsson-Timmings, J., Kristell, C., Henningson, F., Lyckman, S., and Bjerling, P. (2009). Reorganization of chromatin is an early response to nitrogen starvation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* 118c, 99-112.
- Aligianni, S., Lackner, D.H., Klier, S., Rustici, G., Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Codlin, S., Brazma, A., de Bruin, R.A., and Bahler, J. (2009). The fission yeast homeodomain protein Yox1p binds to MBF and confines MBF-dependent cell-cycle transcription to G1-S via negative feedback. *PLoS Genet* 5c, e1000626.
- Angermayr, M., and Bandlow, W. (1997). The general regulatory factor Reb1p controls basal, but not Gal4p-mediated, transcription of the GCY1 gene in yeast. *Mol Gen Genet* 256c, 682-689.
- Angermayr, M., Oechsner, U., and Bandlow, W. (2003). Reb1p-dependent DNA bending effects nucleosome positioning and constitutive transcription at the yeast profilin promoter. *J Biol Chem* 278c, 17918-17926.
- Araki, T., Langenick, J., Gamper, M., Firtel, R.A., and Williams, J.G. (2008). Evidence that DIF-1 and hyper-osmotic stress activate a Dictyostelium STAT by inhibiting a specific protein tyrosine phosphatase. *Development* 135c, 1347-1353.
- Ayte, J., Leis, J.F., Herrera, A., Tang, E., Yang, H., and DeCaprio, J.A. (1995). The *Schizosaccharomyces pombe* MBF complex requires heterodimerization for entry into S phase. *Mol Cell Biol* 15c, 2589-2599.
- Ayte, J., Schweitzer, C., Zarzov, P., Nurse, P., and DeCaprio, J.A. (2001). Feedback regulation of the MBF transcription factor by cyclin Cig2. *Nat Cell Biol* 3c, 1043-1050.
- Azvolinsky, A., Giresi, P.G., Lieb, J.D., and Zakian, V.A. (2009). Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 34c, 722-734.
- Bahler, J. (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* 39c, 69-94.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37c, W202-208.
- Bairwa, N.K., Zzaman, S., Mohanty, B.K., and Bastia, D. (2010). Replication fork arrest and rDNA silencing are two independent and separable functions of the replication terminator protein Fob1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 285c, 12612-12619.
- Barker, M.G., and Walmsley, R.M. (1999). Replicative ageing in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 15c, 1511-1518.
- Bartsch, I., Schoneberg, C., and Grummt, I. (1988). Purification and characterization of TTFI, a factor that mediates termination of mouse ribosomal DNA transcription. *Mol Cell Biol* 8c, 3891-3897.
- Bastos de Oliveira, F.M., Harris, M.R., Brazauskas, P., de Bruin, R.A., and Smolka, M.B. (2012). Linking DNA replication checkpoint to MBF cell-cycle transcription reveals a distinct class of G1/S genes. *EMBO J* 31c, 1798-1810.
- Baum, B., Nishitani, H., Yanow, S., and Nurse, P. (1998). Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis. *EMBO J* 17c, 5689-5698.
- Belenguer, P., Pelloquin, L., Oustrin, M.L., and Ducommun, B. (1997). Role of the fission yeast nim 1 protein kinase in the cell cycle response to nutritional signals. *Biochem Biophys Res Commun* 232c, 204-208.
- Biswas, S., and Bastia, D. (2008). Mechanistic Insights into Replication Termination as Revealed by Investigations of the Reb1-Ter3 Complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 28c, 6844-6857.

BIBLIOGRAFÍA

- Blanco, M.A., Sanchez-Diaz, A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J* 19c, 3945-3955.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Letters* 247c, 26-39.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55c, 637-643.
- Caetano, C., Klier, S., and de Bruin, R.A. (2011). Phosphorylation of the MBF repressor Yox1p by the DNA replication checkpoint keeps the G1/S cell-cycle transcriptional program active. *PLoS One* 6c, e17211.
- Carmona-Saez, P., Chagoyen, M., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2007). GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 8c, R3.
- Chen, B.R., and Runge, K.W. (2009). A new *Schizosaccharomyces pombe* chronological lifespan assay reveals that caloric restriction promotes efficient cell cycle exit and extends longevity. *Exp Gerontol* 44c, 493-502.
- Correa-Bordes, J., and Nurse, P. (1995). p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell* 83c, 1001-1009.
- Costello, G., Rodgers, L., and Beach, D. (1986). Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2. *Current Genetics* 11c, 119-125.
- Coudreuse, D., and Nurse, P. (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468c, 1074-1079.
- Cunliffe, L., White, S., and McNerny, C.J. (2004). DSC1-MCB regulation of meiotic transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Genet Genomics* 271c, 60-71.
- Dalgaard, J.Z., and Klar, A.J.S. (2000). swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. pombe*. *Cell* 102c, 745-751.
- de Bruin, R.A., Kalashnikova, T.I., Aslanian, A., Wohlschlegel, J., Chahwan, C., Yates, J.R., 3rd, Russell, P., and Wittenberg, C. (2008). DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105c, 11230-11235.
- Defossez, P.A. (1999). Ribosomal DNA circles and aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *M S - Medecine Sciences* 15c, 1454-1455.
- Defossez, P.A., Prusty, R., Kaeberlein, M., Lin, S.J., Ferrigno, P., Silver, P.A., Keil, R.L., and Guarente, L. (1999). Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol Cell* 3c, 447-455.
- DeVoti, J., Seydoux, G., Beach, D., and McLeod, M. (1991). Interaction between ran1+ protein kinase and cAMP dependent protein kinase as negative regulators of fission yeast meiosis. *EMBO J* 10c, 3759-3768.
- Dutta, C., Patel, P.K., Rosebrock, A., Oliva, A., Leatherwood, J., and Rhind, N. (2008). The DNA Replication Checkpoint Directly Regulates MBF-Dependent G1/S Transcription. *Mol Cell Biol* 28c, 5977-5985.
- Eshaghi, M., Lee, J.H., Zhu, L., Poon, S.Y., Li, J., Cho, K.H., Chu, Z., Karuturi, R.K., and Liu, J. (2010). Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H2O2. *PLoS One* 5c, e11620.
- Evers, R., Smid, A., Rudloff, U., Lottspeich, F., and Grummt, I. (1995). Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination. *EMBO J* 14c, 1248-1256.
- Feilotter, H., Nurse, P., and Young, P.G. (1991). Genetic and molecular analysis of cdr1/ nim1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 127c, 309-318.
- Forsburg, S.L. (2003). Growth and manipulation of *S. pombe*. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter* 13c, Unit 13 16.

BIBLIOGRAFÍA

- Forsburg, S.L. (2003). *S. pombe* strain maintenance and media. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al] *Chapter 13c*, Unit 13 15.
- Forsburg, S.L. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology *18c*, 3-9.
- Forsburg, S.L., and Rhind, N. (2006). Basic methods for fission yeast. *Yeast* *23c*, 173-183.
- Furey, T.S. (2012). ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* *13c*, 840-852.
- Gerber, J.K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I., and Grummt, F. (1997). Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell* *90c*, 559-567.
- Gomez, E.B., and Forsburg, S.L. (2004). Analysis of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Methods Mol Biol* *241c*, 93-111.
- Gomez-Escoda, B., Ivanova, T., Calvo, I.A., Alves-Rodrigues, I., Hidalgo, E., and Ayte, J. (2011). Yox1 links MBF-dependent transcription to completion of DNA synthesis. *EMBO Rep* *12c*, 84-89.
- Gordon, C.B., and Fantes, P.A. (1986). The *cdc22* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a cell cycle-regulated transcript. *EMBO J* *5c*, 2981-2985.
- Grant, C.E., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* *27c*, 1017-1018.
- Grummt, I., Maier, U., Ohrlein, A., Hassouna, N., and Bachellerie, J.P. (1985). Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of 28S RNA and involves interaction of factors with repeated sequences in the 3' spacer. *Cell* *43c*, 801-810.
- Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U., and Ohrlein, A. (1986). A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription termination. *Cell* *45c*, 837-846.
- Grummt, I., Sorbaz, H., Hofmann, A., and Roth, E. (1985). Spacer sequences downstream of the 28S RNA coding region are part of the mouse rDNA transcription unit. *Nucleic Acids Res* *13c*, 2293-2304.
- Gutz, H., and Doe, F.J. (1973). Two Different h Mating Types in *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*. *Genetics* *74c*, 563-569.
- Ha, C.W., Sung, M.K., and Huh, W.K. (2012). Nsi1 plays a significant role in the silencing of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *40c*, 4892-4903.
- Hansen, K.R., Burns, G., Mata, J., Volpe, T.A., Martienssen, R.A., Bahler, J., and Thon, G. (2005). Global effects on gene expression in fission yeast by silencing and RNA interference machineries. *Mol Cell Biol* *25c*, 590-601.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* *183c*, 46-51.
- Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhoute, J., and Carr, A.M. (2005). Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *22c*, 1013-1019.
- Hernández, P., Martín-Parras, L., Martínez-Robles, M.L., and Schwartzman, J.B. (1993). Conserved features in the mode of replication of eukaryotic ribosomal RNA genes. *EMBO J* *12c*, 1475-1485.
- Hirano, T., Funahashi, S.I., Uemura, T., and Yanagida, M. (1986). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* cut mutants that block nuclear division but not cytokinesis. *EMBO J* *5c*, 2973-2979.
- Hofmann, J.F., and Beach, D. (1994). *cdt1* is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *EMBO J* *13c*, 425-434.

BIBLIOGRAFÍA

- Holmes, A., Roseaulin, L., Schurra, C., Waxin, H., Lambert, S., Zaratiegui, M., Martienssen, R.A., and Arcangioli, B. (2012). Lsd1 and Lsd2 control programmed replication fork pauses and imprinting in fission yeast. *Cell reports* 2c, 1513-1520.
- Ju, Q.D., Morrow, B.E., and Warner, J.R. (1990). REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essential for growth and bears some resemblance to the oncogene myb. *Mol Cell Biol* 10c, 5226-5234.
- Kanoh, J., and Russell, P. (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 9c, 3321-3334.
- Kawauchi, J., Mischo, H., Braglia, P., Rondon, A., and Proudfoot, N.J. (2008). Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev* 22c, 1082-1092.
- Kitamura, K., Maekawa, H., and Shimoda, C. (1998). Fission Yeast Ste9, a Homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, Is a Novel Negative Regulator of Cell Cycle Progression during G1-Phase. *Mol Biol Cell* 9c, 1065-1080.
- Kitamura, K., Maekawa, H., and Shimoda, C. (1998). Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Mol Biol Cell* 9c, 1065-1080.
- Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D., and Broach, J.R. (2011). Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes Dev*.
- Kobayashi, T., Hidaka, M., Nishizawa, M., and Horiuchi, T. (1992). Identification of a site required for DNA replication fork blocking activity in the rRNA gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 233c, 355-362.
- Kobayashi, T., and Horiuchi, T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* 1c, 465-474.
- Kominami, K., Seth-Smith, H., and Toda, T. (1998). Apc10 and Ste9/Srw1, two regulators of the APC-cyclosome, as well as the CDK inhibitor Rum1 are required for G1 cell-cycle arrest in fission yeast. *Embo J* 17c, 5388-5399.
- Krings, G., and Bastia, D. (2004). swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101c, 14085-14090.
- Krings, G., and Bastia, D. (2004). swi1- and swi3-dependent and independent replication fork arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101c, 14085-14090.
- Kristell, C., Orzechowski Westholm, J., Olsson, I., Ronne, H., Komorowski, J., and Bjerling, P. (2010). Nitrogen depletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* causes nucleosome loss in both promoters and coding regions of activated genes. *Genome Research* 20c, 361-371.
- Kucsera, J., Yarita, K., and Takeo, K. (2000). Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J Microbiol Methods* 41c, 19-21.
- Kumada, K., Yanagida, M., and Toda, T. (1996). Caffeine-resistance in fission yeast is caused by mutations in a single essential gene, *crm1+*. *Mol Gen Genet* 250c, 59-68.
- Lahondès, R., Ribes, V., and Arcangioli, B. (2003). Fission yeast Sap1 protein is essential for chromosome stability. *Eukaryotic Cell* 2c, 910-921.
- Lan, F., Zaratiegui, M., Villen, J., Vaughn, M.W., Verdel, A., Huarte, M., Shi, Y., Gygi, S.P., Moazed, D., Martienssen, R.A., *et al.* (2007). *S. pombe* LSD1 homologs regulate heterochromatin propagation and euchromatic gene transcription. *Mol Cell* 26c, 89-101.
- Lee, M.S., Enoch, T., and Piwnicka-Worms, H. (1994). mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Journal of Biological Chemistry* 269c, 30530-30537.

BIBLIOGRAFÍA

- Linskens, M.H.K., and Huberman, J.A. (1988). Organization of replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8c, 4927-4935.
- Little, R.D., Platt, T.H., and Schildkraut, C.L. (1993). Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol* 13c, 6600-6613.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25c, 402-408.
- López-Estraño, C., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (1998). Co-localization of polar replication fork barriers and rRNA transcription terminators in mouse rDNA. *J Mol Biol* 277c, 249-256.
- López-Estraño, C., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (1999). Characterization of the pea rDNA replication fork barrier: putative cis-acting and trans-acting factors. *Plant Mol Biol* 40c, 99-110.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64c, 1111-1122.
- Maeda, T., Watanabe, Y., Kunitomo, H., and Yamamoto, M. (1994). Cloning of the pka1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* 269c, 9632-9637.
- Maqbool, Z., Kersey, P.J., Fantes, P.A., and McNerny, C.J. (2003). MCB-mediated regulation of cell cycle-specific cdc22+ transcription in fission yeast. *Mol Genet Genomics* 269c, 765-775.
- Martin, S.G., and Berthelot-Grosjean, M. (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* 459c, 852-856.
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M.A., de Prada, J.M., and Moreno, S. (2000). The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Mol Biol Cell* 11c, 543-554.
- Martin-Castellanos, C., Labib, K., and Moreno, S. (1996). B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *EMBO J* 15c, 839-849.
- Martin-Castellanos, C., and Moreno, S. (1996). Regulation of G1 progression in fission yeast by the rum1+ gene product. *Progress in cell cycle research* 2c, 29-35.
- Mata, J., and Bahler, J. (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103c, 15517-15522.
- Mata, J., Lyne, R., Burns, G., and Bahler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* 32c, 143-147.
- Maundrell, K. (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123c, 127-130.
- McNerny, C.J., Kersey, P.J., Creanor, J., and Fantes, P.A. (1995). Positive and negative roles for cdc10 in cell cycle gene expression. *Nucleic Acids Res* 23c, 4761-4768.
- Mejia-Ramirez, E., Sanchez-Gorostiaga, A., Krimer, D.B., Schvartzman, J.B., and Hernandez, P. (2005). The mating type switch-activating protein Sap1 is required for replication fork arrest at the rRNA genes of fission yeast. *Mol Cell Biol* 25c, 8755-8761.
- Melekhovets, Y.F., Shwed, P.S., and Nazar, R.N. (1997). In vivo analyses of RNA polymerase I termination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* 25c, 5103-5109.
- Miwa, Y., Ohtsuka, H., Naito, C., Murakami, H., and Aiba, H. (2011). Ecl1, a regulator of the chronological lifespan of *Schizosaccharomyces pombe*, is induced upon nitrogen starvation. *Biosci Biotechnol Biochem* 75c, 279-283.

BIBLIOGRAFÍA

- Mohanty, B.K., Bairwa, N.K., and Bastia, D. (2006). The Tof1p-Csm3p protein complex counteracts the Rrm3p helicase to control replication termination of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103c**, 897-902.
- Mohanty, B.K., and Bastia, D. (2004). Binding of the replication terminator protein Fob1p to the Ter sites of yeast causes polar fork arrest. *Journal of Biological Chemistry* **279c**, 1932-1941.
- Moreno, S., Labib, K., Correa, J., and Nurse, P. (1994). Regulation of the cell cycle timing of Start in fission yeast by the *rum1+* gene. *Journal of cell science Supplement* **18c**, 63-68.
- Moreno, S., and Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature* **367c**, 236-242.
- Morrow, B.E., Johnson, S.P., and Warner, J.R. (1993). The rRNA enhancer regulates rRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13c**, 1283-1289.
- Morrow, B.E., Ju, Q., and Warner, J.R. (1990). Purification and characterization of the yeast rDNA binding protein REB1. *Journal of Biological Chemistry* **265c**, 20778-20783.
- Morrow, B.E., Ju, Q., and Warner, J.R. (1993). A bipartite DNA-binding domain in yeast Reb1p. *Mol Cell Biol* **13c**, 1173-1182.
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459c**, 857-860.
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459c**, 857-860.
- Moser, B.A., Brondello, J.M., Baber-Furnari, B., and Russell, P. (2000). Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol Cell Biol* **20c**, 4288-4294.
- Neely, L.A., and Hoffman, C.S. (2000). Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Mol Cell Biol* **20c**, 6426-6434.
- Nemeth, A., Perez-Fernandez, J., Merkl, P., Hamperl, S., Gerber, J., Griesenbeck, J., and Tschochner, H. (2013). RNA polymerase I termination: Where is the end? *Biochim Biophys Acta* **1829c**, 306-317.
- Nemeth, A., Strohner, R., Grummt, I., and Langst, G. (2004). The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes in vivo. *Nucleic Acids Res* **32c**, 4091-4099.
- Noda, T. (2008). Viability assays to monitor yeast autophagy. *Methods Enzymol* **451c**, 27-32.
- Nogales-Cadenas, R., Carmona-Saez, P., Vazquez, M., Vicente, C., Yang, X., Tirado, F., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2009). GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* **37c**, W317-322.
- Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L.-L., and Russell, P. (2003). Swi1 Prevents Replication Fork Collapse and Controls Checkpoint Kinase Cds1. *Mol Cell Biol* **23c**, 7861-7874.
- Noguchi, E., Noguchi, C., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P. (2004). Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast. *Mol Cell Biol* **24c**, 8342-8355.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344c**, 503-508.
- Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **96c**, 627-637.
- Ohtsuka, H., Mita, S., Ogawa, Y., Azuma, K., Ito, H., and Aiba, H. (2008). A novel gene, *ec1(+)*, extends the chronological lifespan in fission yeast. *FEMS Yeast Res* **8c**, 520-530.

BIBLIOGRAFÍA

- Otsubo, Y., and Yamamoto, M. (2012). Signaling pathways for fission yeast sexual differentiation at a glance. *Journal of Cell Science* 125c, 2789-2793.
- Pancaldi, V., Sarac, O.S., Rallis, C., McLean, J.R., Prevorsevsky, M., Gould, K., Beyer, A., and Bahler, J. (2012). Predicting the fission yeast protein interaction network. *G3 (Bethesda)* 2c, 453-467.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71c, 1286-1290.
- Peng, X., Karuturi, R.K., Miller, L.D., Lin, K., Jia, Y., Kondu, P., Wang, L., Wong, L.S., Liu, E.T., Balasubramanian, M.K., *et al.* (2005). Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. *Mol Biol Cell* 16c, 1026-1042.
- Pfleiderer, C., Smid, A., Bartsch, I., and Grummt, I. (1990). An undecamer DNA sequence directs termination of human ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res* 18c, 4727-4736.
- Rallis, C., Codlin, S., and Bahler, J. (2013). TORC1 signaling inhibition by rapamycin and caffeine affect lifespan, global gene expression and cell proliferation of fission yeast. *Aging Cell*.
- Ralser, M., Wamelink, M.M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E.A., Klipp, E., Jakobs, C., Breitenbach, M., Lehrach, H., *et al.* (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of biology* 6c, 10.
- Reiter, A., Hamperl, S., Seitz, H., Merkl, P., Perez-Fernandez, J., Williams, L., Gerber, J., Nemeth, A., Leger, I., Gadai, O., *et al.* (2012). The Reb1-homologue Ydr026c/Nsi1 is required for efficient RNA polymerase I termination in yeast. *EMBO J* 31c, 3480-3493.
- Rhee, H.S., and Pugh, B.F. (2011). Comprehensive genome-wide protein-DNA interactions detected at single-nucleotide resolution. *Cell* 147c, 1408-1419.
- Rhind, N., and Russell, P. (2001). Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Mol Cell Biol* 21c, 1499-1508.
- Rodriguez-Sanchez, L., Rodriguez-Lopez, M., Garcia, Z., Tenorio-Gomez, M., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernandez, P. (2011). The fission yeast rDNA-binding protein Reb1 regulates G1 phase under nutritional stress. *J CELL SCI* 124c, 25-34.
- Rodríguez-Sánchez, L., Rodríguez-López, M., Garcia, Z., Tenorio-Gómez, M., Schvartzman, J.B., Krimer, D.B., and Hernández, P. (2011). The fission yeast rDNA-binding protein Reb1 regulates G1 phase under nutritional stress. *J Cell Sci* 124c, 25-34.
- Roux, A.E., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G., and Rokeach, L.A. (2006). Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2. *Aging Cell* 5c, 345-357.
- Russell, P., and Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 49c, 559-567.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C.J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P., and Bahler, J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36c, 809-817.
- Sabouri, N., McDonald, K.R., Webb, C.J., Cristea, I.M., and Zakian, V.A. (2012). DNA replication through hard-to-replicate sites, including both highly transcribed RNA Pol II and Pol III genes, requires the *S. pombe* Pfh1 helicase. *Genes Dev* 26c, 581-593.
- Sajiki, K., Hatanaka, M., Nakamura, T., Takeda, K., Shimanuki, M., Yoshida, T., Hanyu, Y., Hayashi, T., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (2009). Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *Journal of Cell Science* 122c, 1418-1429.
- Sanchez, J.A., Kim, S.M., and Huberman, J.A. (1998). Ribosomal DNA replication in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research* 238c, 220-230.

BIBLIOGRAFÍA

- Sánchez-Gorostiaga, A., López-Estraño, C., Krimer, D.B., Schwartzman, J.B., and Hernández, P. (2004). Transcription termination factor reb1p causes two replication fork barriers at its cognate sites in fission yeast ribosomal DNA in vivo. *Mol Cell Biol* 24c, 398-406.
- Sander, E.E., Mason, S.W., Munz, C., and Grummt, I. (1996). The amino-terminal domain of the transcription termination factor TTF-I causes protein oligomerization and inhibition of DNA binding. *Nucleic Acids Res* 24c, 3677-3684.
- Sato, M., Dhut, S., and Toda, T. (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22c, 583-591.
- Schmidt, D., Wilson, M.D., Spyrou, C., Brown, G.D., Hadfield, J., and Odom, D.T. (2009). ChIP-seq: using high-throughput sequencing to discover protein-DNA interactions. *Methods* 48c, 240-248.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3c, 1101-1108.
- Sinclair, D.A., and Guarente, L. (1997). Extrachromosomal rDNA circles- A cause of aging in yeast. *Cell* 91c, 1033-1042.
- Singh, S.K., Sabatinos, S., Forsburg, S., and Bastia, D. (2010). Regulation of Replication Termination by Reb1 Protein-Mediated Action at a Distance. *Cell* 142c, 868-878.
- Singh, S.K., Sabatinos, S., Forsburg, S., and Bastia, D. (2010). Regulation of replication termination by Reb1 protein-mediated action at a distance. *Cell* 142c, 868-878.
- Smid, A., Finsterer, M., and Grummt, I. (1992). Limited proteolysis unmasks specific DNA-Binding of the murine RNA polymerase I-Specific transcription termination factor TTFI. *J Mol Biol* 227c, 635-647.
- Sommariva, E., Pellny, T.K., Karahan, N., Kumar, S., Huberman, J.A., and Dalgaard, J.Z. (2005). *Schizosaccharomyces pombe* Swi1, Swi3, and Hsk1 Are Components of a Novel S-Phase Response Pathway to Alkylation Damage. *Mol Cell Biol* 25c, 2770-2784.
- Steglich, B., Filion, G.J., van Steensel, B., and Ekwall, K. (2012). The inner nuclear membrane proteins Man1 and Ima1 link to two different types of chromatin at the nuclear periphery in *S. pombe*. *Nucleus* 3c, 77-87.
- Stumpff, J., Duncan, T., Homola, E., Campbell, S.D., and Su, T.T. (2004). *Drosophila* Wee1 kinase regulates Cdk1 and mitotic entry during embryogenesis. *Curr Biol* 14c, 2143-2148.
- Su, S.S., Tanaka, Y., Samejima, I., Tanaka, K., and Yanagida, M. (1996). A nitrogen starvation-induced dormant G0 state in fission yeast: the establishment from uncommitted G1 state and its delay for return to proliferation. *Journal of Cell Science* 109 (Pt 6)c, 1347-1357.
- Sveiczzer, A., Csikasz-Nagy, A., Gyorffy, B., Tyson, J.J., and Novak, B. (2000). Modeling the fission yeast cell cycle: quantized cycle times in wee1- cdc25Delta mutant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97c, 7865-7870.
- Tabas-Madrid, D., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A. (2012). GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res* 40c, W478-483.
- Taricani, L., Tejada, M.L., and Young, P.G. (2002). The Fission Yeast ES2 Homologue, Bis1, Interacts with the Ish1 Stress-responsive Nuclear Envelope Protein. *J Biol Chem* 277c, 10562-10572.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S.E., Uhlmann, F., *et al.* (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* 14c, 2757-2770.

BIBLIOGRAFÍA

- Tournier, S., and Millar, J.B. (2000). A role for the START gene-specific transcription factor complex in the inactivation of cyclin B and Cut2 destruction. *Mol Biol Cell* 11c, 3411-3424.
- Tyson, J.J., CsikaszNagy, A., and Novak, B. (2002). The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays* 24c, 1095-1109.
- Tyson, J.J., and Novak, B. (2011). Cell cycle: who turns the crank? *Current biology : CB* 21c, R185-187.
- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A.M., and Vandenhaute, J. (2005). Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* 22c, 1061-1068.
- Wang, S.W., Norbury, C., Harris, A.L., and Toda, T. (1999). Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. *Journal of Cell Science* 112 (Pt 6)c, 927-937.
- Watt, S., Mata, J., Lopez-Maury, L., Marguerat, S., Burns, G., and Bahler, J. (2008). urg1: a uracil-regulatable promoter system for fission yeast with short induction and repression times. *PLoS One* 3c, e1428.
- Willer, M., Hoffmann, L., Styrkarsdottir, U., Egel, R., Davey, J., and Nielsen, O. (1995). Two-step activation of meiosis by the *mat1* locus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 15c, 4964-4970.
- Wilson-Grady, J.T., Villen, J., and Gygi, S.P. (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* 7c, 1088-1097.
- Wittenberg, C., and Reed, S.I. (2005). Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24c, 2746-2755.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415c, 871-880.
- Woolcock, K.J., Stunnenberg, R., Gaidatzis, D., Hotz, H.R., Emmerth, S., Barraud, P., and Buhler, M. (2012). RNAi keeps Atf1-bound stress response genes in check at nuclear pores. *Genes Dev* 26c, 683-692.
- Xiang, Z., Wood, V., Rajandream, M.A., Barrell, B.G., Moore, K., Hunt, C., and Aves, S.J. (2000). The mating-type region of *Schizosaccharomyces pombe* h(-S) 972: sequencing and analysis of 69 kb including the expressed *mat1* locus. *Yeast* 16c, 1061-1067.
- Yamaguchi, S., Murakami, H., and Okayama, H. (1997). A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol Biol Cell* 8c, 2475-2486.
- Yamaguchi, S., Murakami, H., and Okayama, H. (1997). A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Mol Biol Cell* 8c, 2475-2486.
- Yanagida, M. (2009). Cellular quiescence: are controlling genes conserved? *Trends Cell Biol* 19c, 705-715.
- Zhao, A., Guo, A., Liu, Z., and Pape, L. (1997). Molecular cloning and analysis of *Schizosaccharomyces pombe* Reb1p: sequence-specific recognition of two sites in the far upstream rDNA intergenic spacer. *Nucleic Acids Res* 25c, 904-910.
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I.A., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Hayles, J., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2008). Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One* 3c, e2842.

Tabla S1. valores de los picos

Pico nº	FDR (%)	número de lecturas	nº lecturas Fw	nº de lecturas Rv	diferencia normalizada	valor-p filtro Wilcoxon
1	0	1671	856	815	0.02	0
2	0	1469	712	757	0.03	0
3	3.00E-16	188	89	99	0.05	3.49E-07
4	1.76E-03	125	66	59	0.06	6.46E-05
5	1.55E-20	237	117	120	0.01	6.31E-07
6	3.01	205	103	102	4.88E-03	1.73E-06
7	0.87	96	56	40	0.17	1.30E-05
8	0.03	247	126	121	0.02	1.14E-05
9	3.79E-70	504	250	254	7.94E-03	0
10	1.18E-149	844	398	446	0.06	0
11	1.74E-130	786	394	392	2.54E-03	0
12	1.64	131	60	71	0.08	9.88E-08
13	0.09	296	146	150	0.01	7.18E-08
14	1.24E-03	114	60	54	0.05	1.79E-07
15	3.72E-34	266	150	116	0.13	8.10E-15
16	1.01E-92	495	224	271	0.09	0
17	1.12E-202	955	486	469	0.02	0
18	2.71	156	61	95	0.22	8.11E-07
19	1.65	164	74	90	0.1	1.94E-05
20	1.24	169	85	84	5.92E-03	3.67E-05
21	0.62	59	29	30	0.02	1.62E-06
22	1.76E-264	1334	711	623	0.07	0
23	7.63E-11	174	92	82	0.06	6.27E-09
24	1.52E-08	129	63	66	0.02	1.59E-05
25	6.20E-195	1061	496	565	0.07	0
26	2.39E-75	447	204	243	0.09	0
27	6.81E-50	420	215	205	0.02	6.32E-13
28	0	1727	842	885	0.02	0
29	2.58E-22	208	93	115	0.11	4.54E-08
30	1.54	85	44	41	0.04	5.45E-05
31	7.49E-207	949	491	458	0.03	0
32	8.10E-19	578	273	305	0.06	6.44E-11
33	0	1630	794	836	0.03	0
34	2.49E-59	325	166	159	0.02	0
35	2.71	134	62	72	0.07	1.83E-08
36	1.35E-35	312	162	150	0.04	2.83E-15
37	7.58E-180	994	510	484	0.03	0
38	0.05	77	36	41	0.06	5.02E-05
39	2.21E-16	189	86	103	0.09	3.33E-16
40	0.33	360	168	192	0.07	1.89E-08
41	1.01E-16	252	121	131	0.04	3.01E-05
42	0.57	144	62	82	0.14	5.74E-08
43	2.86E-33	274	136	138	7.30E-03	2.22E-16
44	2.10E-21	269	124	145	0.08	2.17E-08
45	0.52	170	88	82	0.04	1.07E-09

Pico nº	FDR (%)	número de lecturas	nº lecturas Fw	nº de lecturas Rv	diferencia normalizada	valor-p filtro Wilcoxon
46	0	1885	889	996	0.06	0
47	6.08E-05	138	77	61	0.12	1.84E-05
48	5.27E-03	138	64	74	0.07	3.40E-06
49	2.43E-07	104	50	54	0.04	4.99E-06
50	6.94E-04	93	53	40	0.14	3.32E-05
51	0	3244	1714	1530	0.06	0
52	1.43E-06	306	143	163	0.07	0
53	1.21E-191	841	417	424	8.32E-03	0
54	4.62E-03	143	68	75	0.05	1.14E-05
55	4.03E-03	147	88	59	0.2	4.80E-06
56	6.67E-229	1009	490	519	0.03	0
57	1.68E-235	1130	569	561	7.08E-03	0
58	1.05	96	47	49	0.02	2.34E-05
59	0.17	145	83	62	0.14	6.87E-05
60	1.77E-71	531	290	241	0.09	0
61	6.91E-125	1543	770	773	1.94E-03	0
62	0	1650	814	836	0.01	0
63	5.47E-102	1844	921	923	1.08E-03	0
64	2.92E-31	759	359	400	0.05	1.25E-10
65	1.23E-17	514	230	284	0.11	8.77E-05
66	0	143425	70479	72946	0.02	7.55E-15
67	0	145427	71829	73598	0.01	3.68E-05
68	1.39E-09	212	128	84	0.21	2.33E-08
69	9.45E-03	238	121	117	0.02	5.17E-05
70	0.14	168	88	80	0.05	3.82E-06
71	0.02	117	54	63	0.08	3.60E-05
72	3.01	206	102	104	9.71E-03	1.62E-06
73	0.14	177	87	90	0.02	6.37E-09
74	5.79E-03	157	81	76	0.03	3.00E-07
75	2.36E-03	146	77	69	0.05	4.62E-05
76	2.45E-15	184	97	87	0.05	2.97E-06
77	0.13	121	65	56	0.07	4.07E-05
78	3.19E-03	113	64	49	0.13	5.70E-05
79	1.77	83	43	40	0.04	2.96E-06
80	0	161830	81321	80509	5.02E-03	0
81	8.68E-03	141	71	70	7.09E-03	4.34E-07
82	1.00E-03	104	61	43	0.17	2.86E-07
83	0.02	79	35	44	0.11	2.12E-06

Tabla S2. Clasificación funcional de Genes con Pico de Reb1 en 5'. (En rojo genes que se encuentran clasificados varias veces)

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
Regulación del ciclo celular				
Reguladores de G1/S				
<i>mis4</i>	SPAC31A2.05c	Adherina. Cargador de cohesinas. Cohesión de las cromátidas hermanas. Unión de los microtúbulos al cinetocoro. α Regulación positiva de la unión de las cromátidas hermanas. Regulación negativa de la transición G0/G1. Localización de las cohesinas en la cromatina	Próximo al TSS	4
<i>cig2</i>	SPAPB2B4.03	Ciclina tipo B específica de G1 /S. Regulador de la actividad quinasa dependiente de ciclina. <i>cig2</i> / <i>cyc17</i>	Próximo al TSS	18
<i>srw1</i>	SPAC144.13c	Inhibidor de CDK. Activador del complejo promotor de la anafase mitótica (APC), promoviendo la parada en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno. <i>Srw1</i> / <i>ste9</i>	5' UTR	25
<i>gcn2</i>	SPBC36B7.09	eIF2 alfa quinasa. Proteína de unión a tRNA. Actividad serín-treonín-quinasa. Actividad de homodimerización. Inicio de la traducción citoplasmática. Fosforilación de proteínas. Regulación del checkpoint de la transición G1/S. Regulación del inicio de la traducción en respuesta a estrés osmótico. Regulación negativa de inicio de la traducción en respuesta a ayuno de nitrógeno.	en 5' del TSS	54
Replicación				
<i>reb1</i>	SPBC1198.11c / SPBC660.01c	Terminador transcripcional de transcritos por la RNA Pol I, proteína de unión a las barreras para las horquillas replicativas en el rDNA (barreras 2 y 3), proteína de unión a secuencias de DNA específicas. Regulador de la transcripción de <i>ste9</i> .	5' UTR	34
<i>cdc18</i>	SPBC14C8.07c	Cargador de MCM. Ensamblaje del complejo pre-replicative. Iniciación de la replicación dependiente de DNA. Checkpoint replicativo	Próximo al TSS	52
<i>rev1</i>	SPBC1347.01c / SPBC215.16c	Deoxicitidil transferasa (putativa). Unión a iones magnesio. Unión DNA dañado, Actividad DNA polimerasa dirigida por DNA. Actividad deoxicitidil transferasa. Reparación de daño en el DNA. Reparación de DNA mitocondrial	Próximo al TSS	60
	SPAC212.06c	DNA helicasa (truncada)	en 5' del TSS	1
Reguladores de G2/M				
<i>nim1</i>	SPAC644.06c	Serín-treonín-proteín-quinasa. Participa en la fosforilación inhibitoria de la proteína Wee1. Regulación negativa de la transición G2/M. Regulación negativa de la actividad protéín-quinasa dependiente de ciclina. Activador del crecimiento celular bipolar. <i>nim1</i> / <i>cdr1</i>	Próximo al TSS	17
Respuesta a daño en el DNA				
<i>cdt2</i>	SPAC17H9.19c	Proteína de tipo WD. Se une a otras proteínas. Participa en el Checkpoint de replicación. Regulador positivo de la actividad ubiquitin protéín ligasa. <i>cdt2</i> / <i>sev1</i>	Próximo al TSS	12
Remodelación de cromatina				

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>nrc1</i>	SPAC631.02	Regulador negativo de condensinas. Remodelador de cromatina	5' UTR	13
<i>bdc1</i>	SPBC21D10.10	Proteína que contiene bromodominio. Remodelador de cromatina. Acetilación de histonas	en 5' del TSS	55
<i>psc3</i>	SPAC17H9.20	Complejo de cohesinas mitóticas. No SMC. Requerido para la cohesión de cromátidas hermanas.	en 5' del TSS	12
División celular				
Anillo contráctil				
<i>cdc12</i>	SPAC1F5.04c	Formina. Participa en la citocinesis. Proteína de unión a actina. Unión a Rho GTPasa. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina. Regulación de la polimerización de los filamentos de actina.	TSS	3
<i>acp2</i>	SPAC631.01c	Proteína de "capping" de F-actina. Se une a los filamentos de actina. Antagonista de Cdc12. Regulador negativo de la despolimerización de actina.	Próximo al TSS	13
<i>adf1</i>	SPAC20G4.06c	Cofilina. Factor despolimerizador de actina. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina. Despolimerización de los filamentos de actina. adf1 / cof1	Próximo al TSS	29
Otros				
	SPAC15F9.01c	Proteína de la familia asociada al cinetocoro central.	Próximo al TSS	15
<i>bgs1</i>	SPBC19G7.05c	1,3-beta-glucan sintasa (subunidad catalítica). Biogénesis de la pared celular, biogénesis del septo. Regulación de la citocinesis. Ensamblaje de la pared de las ascoporas. Bgs1/ cps1/ drc1	Próximo al TSS	53
<i>ags1</i>	SPCC17A7.01	alfa-1,4-glucan sintasa. Actividad alfa amilasa. Organización de la pared celular, biosíntesis de alfa glucano. ags1 / mok1	Próximo al TSS	74
<i>mpg1</i>	SPCC1906.01	manosa-1-fosfato guanil-transferasa. Proceso de biosíntesis de la pared celular. Glicosilación de proteínas. Control del checkpoint celular (Activa a Wee1). Ensamblaje del septo. Citocinesis	próximo al TSS	76
<i>rga7</i>	SPBC23G7.08c	GTPasa tipo Rho. Organización del citoesqueleto de actina	TSS	48
Meiosis				
<i>mfr1</i>	SPBC1198.12, SPBC660.02	Proteína relacionada con Fizzy. Participa en la anafase meiótica II. Formación de ascoporas. Activación de APC	en 5' del TSS 34	34
RNA				
Traducción				
<i>tif224</i>	SPAC21E11.06	subunidad Delta del factor iniciador de la traducción eIF2B.	Próximo al TSS	23
	SPBC530.06c	Subunidad alfa del factor iniciador de la traducción eIF3 (putativo). Iniciación de la traducción.	Próximo al TSS	39

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>gcn2</i>	SPBC36B7.09	eIF2 alfa quinasa. Proteína de unión a tRNA. Actividad serín-treonín-quinasa. Actividad de homodimerización. Inicio de la traducción citoplasmática. Fosforilación de proteínas. Regulación del Checkpoint de la transición G1/S. Regulación del inicio de la traducción en respuesta a estrés osmótico. Regulación negativa de inicio de la traducción en respuesta a ayuno de nitrógeno.	en 5' del TSS	54
Maduración del RNA				
Splicing				
<i>lsm6</i>	SPAC2F3.17c	Proteína asociada a U6 snRNP (putativa). Procesamiento de tRNA. Maduración de SSU-RNA. Splicing	5' del TSS	21
<i>saf3</i>	SPAC1782.03	Factor asociado al splicing	Próximo al TSS	27
<i>sap145</i>	SPAC22F8.10c	Proteína asociada a U2 snRNP (putativa). Ensamblaje del complejo del espliceosoma	Próximo al TSS	28
Regulación transcripcional				
<i>res2</i>	SPAC22F3.09C	subunidad Res2 del complejo iniciador de la transcripción MBF, res2/ pct1/ mcs1	TSS	5
<i>rbx1</i>	SPAC23H4.18c	Actividad ubiquitin-proteín-ligasa, unión a proteínas. rbx1 /pip1	5' TSS	8
<i>reb1</i>	SPBC1198.11c / SPBC660.01c	Terminador transcripcional de transcritos por la RNA Pol I, proteína de unión a las barreras para las horquillas replicativas en el rDNA (barreras 2 y 3), proteína de unión a secuencias de DNA específicas. Regulador de la transcripción de ste9.	5' UTR	34
<i>mbx1</i>	SPBC19G7.06	Factor de transcripción de tipo MADS-box. De unión a la región promotora de genes transcritos por la RNA Pol II, involucrado en la activación de la transcripción. Tiene capacidad de dimerización.	Próximo al TSS	53
<i>ste11</i>	SPBC32C12.02.59	Factor de transcripción involucrado en la regulación de la transcripción por la RNA Pol II. Participa en la respuesta a estrés y es necesario para la regulación de la transcripción durante el proceso de meiosis, forma parte del complejo Tor2-Mei2-Ste11. ste11/ aff1/ stex	5' TSS	59
Regulación de proteínas				
Plegamiento proteico				
<i>ssc1</i>	SPAC664.11	Proteína mitocondrial de choque térmico (Hsp70). Se une a proteínas mal plegadas. Encargada de importación de proteínas a la mitocondria. Involucrada en la respuesta celular a estrés.	5' del TSS	10
<i>cyp8</i>	SPAC21E11.05c	peptidil-prolil-cis-trans isomerasa de la familia cicofilina. Actividad peptidil prolil cis- trans isomerasa. Involucrada en plegamiento de proteínas y ubiquitinación	TSS	23
<i>fkbp39</i>	SPBC1347.02	Peptidil prolil cis- trans isomerasa del tipo FKBP (putativo). Involucrada en plegamiento proteico	Próximo al TSS	60
Ubiquitinación				

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>rbx1</i>	SPAC23H4.18c	Actividad ubiquitín-proteín-ligasa, unión a proteínas. <i>rbx1 / pip1</i>	5' TSS	8
<i>cdt2</i>	SPAC17H9.19c	Proteína de tipo WD. Se une a otras proteínas. Participa en el Checkpoint de replicación. Regulador positivo de la actividad ubiquitín-proteín-ligasa. <i>cdt2/ sev1</i>	Próximo al TSS	12
	SPAC2F3.16	Ubiquitín proteín ligasa E3 (putativa). Ubiquitinación de proteínas. Transporte de electrones. unión a zinc.	Próximo al TSS	22
<i>cyp8</i>	SPAC21E11.05c	peptidil prolil cis- trans isomerasa de la familia cicofilina. Actividad peptidil prolil cis- trans isomerasa. Involucrada en plegamiento de proteínas y ubiquitinación	TSS	23
<i>rpn2</i>	SPBC17D11.07c	Subunidad reguladora del proteasoma 19S (putativa). Actividad endopeptidasa. Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	TSS	56
	SPBC17D11.08	Proteína de tipo WD. Ubiquitinación de proteínas. Respuesta a estrés celular. Forma parte del complejo Ubiquitín ligasa RING	en 5' del TSS	56
Fosforilación				
<i>nim1</i>	SPAC644.06c	Serín-treonín-proteín quinasa. Participa en la fosforilación inhibitoria de la proteína Wee1. Regulación negativa de la transición G2/M. Regulación negativa de la actividad proteín quinasa dependiente de ciclina. Activador del crecimiento celular bipolar. <i>nim1 / cdr1</i>	Próximo al TSS	17
<i>gcn2</i>	SPBC36B7.09	eIF2 alfa quinasa. Proteína de unión a tRNA. Actividad serín-treonín-quinasa. Actividad de homodimerización. Inicio de la traducción citoplasmática. Fosforilación de proteínas. Regulación del Checkpoint de la transición G1/S. Regulación del inicio de la traducción en respuesta a estrés osmótico. Regulación negativa de inicio de la traducción en respuesta a ayuno de nitrógeno.	en 5' del TSS	54
otros				
	SPBC106.07c	Proteína relacionada con la proteína Nat2 de N alfa acetilación. Actividad de acetilación de metioninas.	en 5' del TSS	38
	SPBC36B7.08c	Proteína de ensamblaje de nucleosoma (putativa). Actividad Acetil transferasa.	TSS	54
<i>bdc1</i>	SPBC21D10.10	Proteína que contiene bromodominio. Remodelador de cromatina. Acetilación de histonas	en 5' del TSS	55
Respuesta a estrés				
<i>ssc1</i>	SPAC664.11	Proteína mitocondrial de choque térmico (Hsp70). Se une a proteínas mal plegadas. Encargada de importación de proteínas a la mitocondria. Involucrada en la respuesta celular a estrés.	5' del TSS	10
<i>gdi1</i>	SPAC22H10.12c	Inhibidor de la disociación de GDP. Involucrado en el transporte mediante vesículas, involucrado en la respuesta a estrés celular. <i>gdi1 / sec19</i>	TSS	14
	SPAC16A10.01	proteína de la familia DUF1212.	en 5' del TSS	19

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>tps1</i>	SPAC328.03	alfa, alfa-trehalosa-fosfato sintasa. Involucrada en la respuesta a estrés osmótico. Proceso de biosíntesis de trehalosa. Formación de ascosporas	5' UTR	20
<i>srw1</i>	SPAC144.13c	Inhibidor de CDK. Activador del complejo promotor de la anafase mitótica (APC), promoviendo la parada en G1 en respuesta al ayuno de nitrógeno. <i>Srw1/ ste9</i>	5' UTR	25
<i>plc1</i>	SPAC22F8.11	Fosfoinosítido fosfolipasa C. Actividad fosfatidil inositol fosfolipasa. Transducción de señales. Proteína de unión a calcio. Se une a las proteínas <i>rac24</i> y <i>rad25</i> . Regulación del proceso metabólico de los fosfatos. Respuesta celular al daño por radiación uv. Proceso catabólico de lípidos.	en 5' del TSS	28
	SPBC660.16	Fosfogluconato deshidrogenasa. Participa en la respuesta celular al estrés.	en 5' del TSS	36
<i>pgr1</i>	SPBC17A3.07	Glutación reductasa mitocondrial. Actividad reductasa de disulfidos. Proteína de unión a NADP, proceso metabólico del glutatión. Participa en la homeostasis redox y en la respuesta celular al estrés oxidativo. <i>pgr1 /pi039</i>	próximo al TSS	43
<i>gcn2</i>	SPBC36B7.09	eIF2 alfa quinasa. Proteína de unión a tRNA. Actividad serín-treonín-quinasa. Actividad de homodimerización. Inicio de la traducción citoplasmática. Fosforilación de proteínas. Regulación del Checkpoint de la transición G1/S. Regulación del inicio de la traducción en respuesta a estrés osmótico. Regulación negativa de inicio de la traducción en respuesta a ayuno de nitrógeno.	en 5' del TSS	54
	SPBC17D11.08	Proteína de tipo WD. Ubiquitinación de proteínas. Respuesta a estrés celular. Forma parte del complejo Ubiquitin ligasa RING	en 5' del TSS	56
<i>ste11</i>	SPBC32C12.02.59	Factor de transcripción involucrado en la regulación de la transcripción por la RNA Pol II. Participa en la respuesta a estrés y es necesario para la regulación de la transcripción durante el proceso de meiosis, forma parte del complejo Tor2-Mei2-Ste11. <i>ste11/ aff1/ stex</i>	5' TSS	59
<i>rev1</i>	SPBC1347.01c / SPBC215.16c	Deoxicitidil transferasa (putativa). Unión a iones magnesio. Unión DNA dañado, Actividad DNA polimerasa dirigida por DNA. Actividad deoxicitidil transferasa. Reparación de daño en el DNA. Reparación de DNA mitocondrial	Próximo al TSS	60
<i>pil1</i>	SPCC736.15	proteína del eisosoma. Actividad proteín quinasa inhibitoria. Involucrada en la endocitosis. Respuesta celular al estrés	en 5' del TSS	69
	SPCC63.14	Proteína fúngica conservada.	en 5' del TSS	72
<i>atg4*</i>	SPAC19B12.08	Deconjugador de Atg8 (putativo). Actividad endopeptidasa de cisteínas. Ensamblaje de vacuolas. Proteólisis. Autofagia. Respuesta al ayuno de nitrógeno	en 5' del TSS	30
	SPBC660.05	Proteína conservada en hongos. Respuesta celular al estrés	5' UTR	35

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>fbp1</i>	SPBC1198.14c / SPBC660.04c	fructosa 1,6-bisfosfatasa. Gluconeogénesis. Respuesta a estrés celular	en 5' del TSS	35
Transporte de macromoléculas				
Transporte de proteínas				
<i>pil1</i>	SPCC736.15	proteína del eisosoma. Actividad proteín quinasa inhibitoria. Involucrada en la endocitosis. Respuesta celular al estrés	en 5' del TSS	69
<i>gdi1</i>	SPAC22H10.12c	Inhibidor de la disociación de GDP. Involucrado en el transporte mediante vesículas, involucrado en la respuesta a estrés celular. <i>gdi1</i> / <i>sec19</i>	TSS	14
<i>sec73</i>	SPAC23H3.01	factor de intercambio de nucleótidos Guanilo. Transporte de proteínas. Exocitosis. Transporte mediado por vesículas. Transducción de la señal de proteínas ARF	próximo al TSS	16
<i>sfb3</i>	SPBC4.03c	componente de las vesículas cubiertas con COPII (putativo) . Transporte mediante vesículas entre el retículo endoplasmático y Golgi. Transporte entre endosomas tardíos y vacuolas.	próximo al TSS	41
	SPBC211.03c	Factor de intercambio de nucleótidos guanilos (putativo). Transporte de proteínas. Transporte mediante vesículas entre el retículo endoplasmático y Golgi. Organización del citoesqueleto de actina. Regulación de la transducción de la señal de proteínas ARF al citoplasma	próximo al TSS	58
Transporte de RNA				
<i>seh1</i>	SPAC15F9.02	Nucleoporina. Exportación del RNA del núcleo.	en 5' del TSS	15
<i>mlo3</i>	SPBC1D7.04	Proteína de unión a la secuencia poli(A) del RNA, encargada de la exportación del mRNA del núcleo.	en TSS	44
Transporte de otras moléculas				
<i>klp8</i>	SPAC144.14	proteína tipo quinesina. Transporte basado en microtúbulos. Tiene actividad motora y se une a ATP	en 5' del TSS	25
<i>vrg4</i>	SPAC144.18	Transportador de la GDP-manosa en Golgi. Actividad de transportador transmembrana de nucleótidos-azúcar	5' UTR	26
<i>vma3</i>	SPAC1B3.14	ATPasa tipo V, subunidad C (subunidad proteolipídica). Actividad ATPasa. Mecanismo de endocitosis rotacional. Acidificación de vacuolas. Transporte de protones mediado por hidrólisis de ATP	próximo al TSS	31
<i>nog1</i>		Proteína de unión a GTP. Exportación de las unidades ribosomales del núcleo.	próximo al TSS	42
	SPBC31F10.16	proteína de la familia ChAPs (putativa). Transporte de Golgi a membrana plasmática	en 5' del TSS	57
Metabolismo				
Catabolismo				
<i>plc1</i>	SPAC22F8.11	Fosfoinositido fosfolipasa C. Actividad fosfatidilinositol fosfolipasa. Transducción de señales. Proteína de unión a calcio. Se une a las proteínas <i>rac24</i> y <i>rad25</i> . Regulación del proceso metabólico de los fosfatos. Respuesta celular al daño por radiación uv. Proceso catabólico de lípidos.	en 5' del TSS	28

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>gpm1</i>	SPAC26F1.06	fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato monomérico (putativa). Actividad fosfoglicerato mutasa. Participa en la Gluconeogénesis y en la Glicolisis.	próximo al TSS	32
	SPBC651.02	Bis(5'-adenosil)-triosafosfatasa (putativa). Actividad hidrolasa actuando sobre las uniones carbono- nitrógeno (no peptídicas). Procesos catabólicos	en 5' del TSS	42
<i>eno101</i>	SPBC1815.01	Enolasa (putativa) . Actividad fosfopiruvato hidratasa en al glicolisis. eno101/ eno1.	en 5' del TSS	
<i>rpn2</i>	SPBC17D11.07c	Subunidad reguladora del proteasoma 19S (putativa). Actividad endopeptidasa. Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina	TSS	56
<i>pgk1</i>	SPBC14F5.04c	Actividad fosfoglicerato quinasa. Participa en la Gluconeogénesis y en la glucolisis	5' UTR	61
<i>tpi1*</i>	SPCC24B10.21	Triosa fosfato isomerasa. Gluconeogénesis y glucolisis. Ruta de las pentosas fosfato	en 5' del TSS	73
<i>atg4*</i>	SPAC19B12.08	Deconjugador de Atg8 (putativo). Actividad endopeptidasa de cisteínas. Ensamblaje de vacuolas. Proteólisis. Autofagia. Respuesta al ayuno de nitrógeno	en 5' del TSS	30
Biosíntesis de metabolitos				
<i>lys2</i>	SPAC343.16	Homoaconitato hidratasa. Proteína de unión a iones metálicos. Generación de precursores de metabolitos y energía. Proceso de biosíntesis de lisina vía ácido aminoadípico	5' UTR	9
<i>urg1</i>	SPAC1002.19	GTP ciclo-hidrolasa II (putativa). Proceso de biosíntesis de riboflavinas	próximo al TSS	11
<i>tps1</i>	SPAC328.03	alfa, alfa-trehalosa-fosfato sintasa. Involucrada en la respuesta a estrés osmótico. Proceso de biosíntesis de trehalosa. Formación de ascosporas	5' UTR	20
<i>gpm1</i>	SPAC26F1.06	fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato monomérico (putativa). Actividad fosfoglicerato mutasa. Participa en la Gluconeogénesis y en la Glicolisis.	próximo al TSS	32
<i>kes1</i>	SPBC1271.12	Proteína de unión al oxisterol (Putativa) Proceso de biosíntesis de ergosterol.	5' UTR	37
<i>bgs1</i>	SPBC19G7.05c	1,3-beta-glucan sintasa (subunidad catalítica). Biogénesis de la pared celular, biogénesis del septo. Regulación de la citocinesis. Ensamblaje de la pared de las ascosporas. Bgs1/ cps1/ drc1	Próximo al TSS	53
<i>pgk1</i>	SPBC14F5.04c	Actividad fosfoglicerato quinasa. Participa en la Gluconeogénesis y en la glucolisis	5' UTR	61
<i>tpi1*</i>	SPCC24B10.21	Triosa fosfato isomerasa. Gluconeogénesis y glucolisis. Ruta de las pentosas fosfato	en 5' del TSS	73
<i>mpg1</i>	SPCC1906.01	manosa-1- fosfato guanil transferasa. Proceso de biosíntesis de la pared celular. Glicosilación de proteínas. Control del checkpoint celular (Activa a Wee1). Ensamblaje del septo. Citocinesis	próximo al TSS	76
<i>fbp1</i>	SPBC1198.14c / SPBC660.04c	fructosa 1,6-bisfosfatasa. Gluconeogénesis. Respuesta a estrés celular	en 5' del TSS	35

Gen	ID	Función	Localización del pico	Pico nº
<i>aah3</i>	SPCC63.02c	Homólogo de la Alfa amilasa. Actividad alfa amilasa. Actividad hidrolasa en los enlaces glicosílicos. Regulación de la forma celular. Biogénesis de la pared celular. transporte mediado por vesículas. Catabolismo de polisacáridos	próximo al TSS	71
Otros metabolismo				
	SPAC144.17c	Actividad 6-fosfofructo-2- quinasa (putativa)	en 5' del TSS	26
<i>SPCC794.01c</i>	SPCC794.01c	Glucosa-6 fosfato 1- deshidrogenasa (putativa). Ruta de las pentosas fosfato	5' UTR	68
Mitocondrias				
<i>atp25</i>	SPAC31A2.06	Sintasa de ATP mitocondrial (putativa)	5' del TSS	4
<i>lys2</i>	SPAC343.16	Homoaconitato hidratasa. Proteína de unión a iones metálicos. Generación de precursores de metabolitos y energía. Proceso de biosíntesis de lisina vía ácido aminoadipídico	5' UTR	9
<i>ssc1</i>	SPAC664.11	Proteína mitocondrial de choque térmico (Hsp 70). Se une a proteínas mal plegadas. Encargada de importación de proteínas a la mitocondria. Involucrada en la respuesta celular a estrés.	5' del TSS	10
	<i>SPBC660.16</i>	Fosfogluconato deshidrogenasa. Participa en la respuesta celular al estrés.	en 5' del TSS	36
	<i>SPBC106.07c</i>	Proteína relacionada con la proteína Nat2 de N alfa acetilación. Actividad de acetilación de metioninas.	en 5' del TSS	38
<i>pgr1</i>	SPBC17A3.07	Glutación reductasa mitocondrial. Actividad reductasa de disulfidos. Proteína de unión a NADP, proceso metabólico del glutatión. Participa en la homeostasis redox y en la respuesta celular al estrés oxidativo. pgr1 / pi039	próximo al TSS	43
<i>atp15</i>	SPBC31F10.15c	Subunidad épsilon de la F0-ATPasa. Transporte de protones acoplado a síntesis de ATP	próximo al TSS	57
Señalización				
<i>ecm33</i>	SPAC1F2.01, SPAC23H4.19	Proteína de la pared celular. Transducción de señales. Homeostasis de calcio.	en 5' del TSS	8
Otros				
	SPAC19A8.02	Proteína con dominio de homología a plekstrina	en 5' del TSS	16
	SPAC20G4.09	huérfano de secuencia	próximo al TSS	29
<i>tam10</i>	SPBC14C8.19	Transcritos alterados en meiosis. Huérfano de secuencia	5' UTR	52
	SPBCPT2R1.05c	Pseudogen	en 5' del TSS	62
	SPCC594.01	proteína de la familia DUF1769	5' UTR	70
	SPBC17G9.13c	Proteína conservada en hongos	en 5' del TSS	51
<i>wtf5</i>	SPCC794.02	Elemento Wtf	5' UTR	68
	SPCC4F11.05	Dudoso	en 5' del TSS	76

Tabla S3. Listado de los oligos empleados

Número de primer	nombre que lo identifica	secuencia 5'3'
MR1	MluI-(pIRT2-ars1 (up)):	cccacgcgtCTGATGGAGGACTCGATTTAATG
MR2	bio-MluIpIRT2-leu2 (do)	BIOTIN-cccacgcgtTCCCATAATGGTGAAAGTTCC
MR3	MluIpIRT2-leu2 (do)):	cccacgcgtTCCCATAATGGTGAAAGTTCC
MR4	Pnmt1Fw	GCTACTGGATGGTTCAGTCAC
MR5		ccc GAA TTC cta gtg att gat taa ttt ttg ttc acc gtt caa gtc ttc ctc gga gat ta
MR6	Pste9Rv	AGCATACGACCAGCATCCTT
MR7	25S fw	TCTAGACAGCAGGACGGTGG
MR8	25S rev	5'CGTGCAACTTTCATACGGAGCTT
MR9	MT1	AGA AGA GAG AGT AGT TGA AG
MR10	MP	ACG GTA GTC ATC GGT CTT CC
MR11	MM	TAC GTT CAG TAG ACG TAG TG
MR12	3'EcoReb	CCCGAATTCTCAATTGGAGAATCCAGAAAGTACCACTTTAAAGTCATC AATGGCTGACTTCGTGGCTTC
MR13	5'ecohisreb	cccgaattcATGCATcatCATcatCATcatGATACCTCCGTATTAAATCCGGAAC TTCAGATTCATGGATT
MR14	CkRebMutFw	aggtgtgaatgcctgcgag
MR15	CkRebMutRv	tgtccgcagtcctcatctagc
MR16	IsoAFw	CCCCTCGAGATG GAT ACC TCC GTA TTA AAT C
MR17	IsoBFw	CCCCTCGAGATG AGA AAC TCT ACT TCG AAT C
MR18	IsoCFw	CCCCTCGAGATG TTT TGC AAT CAA ATT TGG G
MR19	Iso Rv	CCCCTCGAGTCA GCA CTG AGC AGC GTA ATC T
MR20	EclFw	ATATGCGAGCACTCGGACTC
MR21	EclRv	TTATCGACATTGCCAAACCA
MR22	ecl ORF fw	GATGGATTTGGATTTTTCAC
MR23	ecl ORF rv	TAAGCACTGAACCGTGGTGT
MR24	ecl2 fw	TTTGCGGAAAACCCACTACT
MR25	ecl2 rv	GTCTGGAAGCGACAAAACC
MR26	ecl3 fw	TCGATGCCGAAGGATTGTAT
MR27	ecl rv	TCAACACTATAATTCTTCAATTCGGTA
MR28	Rebadfw	cccGAATTCatgGATACCTCCGTATTA

MR29	redelFw	CACGAAGCGTTTTGTACGATATTAGCGATTGATAAGTTGAAGTGATTA CTCAATTATAGTACTTCAAAAATATAATCTTTCGGATCCCCGGGTAAAT TAA
MR30	redelRv	TTAATAAGGACTTGTA AAAAGATACAAAGTTACTTAAGTAAGTTAA AAC AAATTTTTTCGTTCAAAAATGTAGGACGGAATTCGAGCTCGTTTA AAC
MR31	ste9pFAFw	TCTGGAAGCTGTTTGATTCTAAATCAAAACACTCCGCTTCCACTATGA GTTCTCCATTTGACCCTACAATGAAAATACGGCGGATCCCCGGGTTA ATTAA
MR32	ste9pFARv	AAAGCGACAAAGGTGTAATATTTTAGTAATAAGATGACAAATATAATGT ACAAAAGACTTCAAAGAGTGAATGTGTTGCAGAATTCGAGCTCGTTT AAAC
MR33	Urg1Fw	CCCACTTTTGACTTCCCTGA
MR34	Urg1Rv	AATGACGACCGTGAACACAA
MR35	Cdr1_fw	CAGGAAAAGATATGGGAC
MR36	Cdr1_rv	TTGGGAAGACTTTAGGGA
MR37	Ssc1_fw	TACCACCACCTCATGTTT
MR38	Ssc1_rv	AGTAATACCTTCGTCACCA
MR39	Lys2_fw	TCGTGGGTTTGCTAGTTT
MR40	Lys2_rv	ATTATAAGGGGATCAGCAGT
MR41	Cox24_fw	CATGTTTCAGCTTCTCCC
MR42	Cox24_rv	CATTAATTCTAGCCATCGAC
MR43	eno101_fw	TATCCACCGTGCTATCGTC
MR44	eno101_rv	AGCCTTGATGTACTTGCC
MR45	Atp15_fw	CGAAAATACAGAGCAACCA
MR46	Atp15_rv	TAGCGAAAATAACCAGCC
MR47	Rpn2_fw	AGTAGGTGAGAAGGAAAGAG
MR48	Rpn2_rv	CTGAACAGGACGAAAGATT
MR49	Bgs1_Mbx1_fw	CGCATAAACGGTGGTAAA
MR50	Bgs1_Mbx1_rv	GGAGAAAAGGGAGAAGGAAAA
MR51	Reb1_fw	AGAAGAGGAAGATTGTCGT
MR52	Reb1_rv:	CTATAAGGAAATGCAGCGT
MR53	ump1_orph_fw	CAGATCCTCCTAAAGCCA
MR54	ump1_orph_rv	CTTCATCATACGCTTCCA
MR55	Ags1_fw	TTTACCATCCTCCCCCTC
MR56	Ags1_rv	CGGTCATGCTTTCTTCTT
MR57	SPCC794.01c_fw	ACGAACCTCATCATCACT
MR58	SPCC794.01c_rv	CTCGCTACCAAATGACT

MR59	Urg1_fw	AAGCTGGAAGTTGGAAGT
MR60	Urg1_rv	AGGGAAGTCAAAAGTGGG
MR61	act1 fw	TCCTCATGCTATCATGCGTCTT
MR62	act1 rv	CCACGCTCCATGAGAATCTTC
MR63	18Srv	CCCTTCCGTCAATTCCTTTA
MR64	25 S Rv	CTTAAGCGCCATCCATTTTC
MR65	RFB2 Fw	GGAATTGGTGGGAAAATACTCA
MR66	RFB2 RV	GGATTTGTGCATTACCCTTACCT
MR67	Igs3 fw	GAAATAGGCACCGAAATGGA
MR68	Igs3 Rv	TCCTTTCAACCACCACTCCT
MR69	P1 Fw	CGAGACCCCCTAATGCTTTT
MR70	P1 Rv	CCAGCTTGGAACCTTGTGAA
MR71	P3 Fw	TACGCTACGCACTCCCTACC
MR72	P3 Rv	TTGAGCGAGGAAAGTGTTGA
MR73	Orph_fw:	CTCTTTACCGCTTACTCT
MR74	Orph_rv	AATTACTACTGCCACCCA
MR75	Cdr1-2_fw	ACACCACAAGACCAAACA
MR76	Cdr1-2_rv	GCCAAAACGAGTACTACG
MR77	Tf2-4_fw	CTCCATCGTTTTGCTCTT
MR78	Tf2-4_rv	CAGCTTCGAGAACTCA
MR79	Atp15_fw	GAAGAGAAAGAGTACAAGG
MR80	Atp15_rv	TCAATGGAGAGTGCTAGT
MR81	Kes1_fw	ATAGGTGGATGGTGGGAA
MR82	Kes1_rv	CGATGCCAGGAAGAAAGT
MR83	Cyp fw	ttccacgattggccatagat
MR84	Cyp rv	ttgttccttggtcgaaaa
MR85	Kes1 fw	ATGAGTAAAACAACGAGTT
MR86	Kes1 rv	ATCCAAGGCAACTGCAAAGT
MR87	Tif fw	gaggcaaaagcgtgaaaaa
MR88	Tif rv	tcgcaacacgctattactgg
MR89	Urg1_2_Rv	aggtaaccaggcctgcaat
MR90	Urg1_2_Fw	gcaatgtctacgcaaactgg
MR91	Kes1_2_Fw	AAGAGGACAAGTCGCCAGAA
MR92	Kes1_2_Rv para el 81	TCTGGCGACTTGTCTCTTT

MR93	Atp15_2 Rv (para el MR79)	ACAATTCGGCAAAGTCTGCT
MR94	Atp15_2 Fw (para el MR80)	AGCAGACTTTGCCGAATTGT
MR95	Cdr1-2_2_rv (para MR75)	CCGTTCCACGTTTCACTTTT
MR96	Cdr1-2_2_Fw (para MR76)	ACGTGGAACGGAAATAGACG
MR97	18S_fw(new)	ACTTGCTCGGCACCTTACG
MR98	IsoRv13myc	cccCTCGAG cta gtg att gat taa ttt ttg ttc acc gtt caa gtc ttc ctc gga gat t
MR99	Reb1MetArg	GAT AAT GTG GAT TCG AGC GCC TTC TTG TCA AAA GTT AAC AAA GGT G TG AAT GCC TGC GAG AAC TCT ACT TCG AAT CAA AC
MR100	Eno101_2_fw	CCATCCTGTCCTGTCTTGGT
MR101	Eno101_2_Rv	AAGGGGCAAGAGATGGAGAT
MR102	enoQfw	TGGTTGGGGTGTATGGTTT
MR103	enoQrv	AAGTTGACCGGCACCAATAC
MR104	rem1 fw	TCGTTCGTCTCCCTTTTCAC
MR105	rem1 rv	GATTGTGGGGGTGCATACAT
MR106	rem_2 fw	AAAGGATGACGCTGTGGAGT
MR107	rem1_2 rv	AACGTGGGGAAACATAGCAC
MR108	orph_q_fw	cgattggaaatccacctgat
MR109	orph_q_rv	ctcaaaccggagatgcagaca
MR110	atp15-qfw	CGCCATTTTTCCATCGAGTA
MR111	arp15-qRv	TGTTCCCAAACGTTCGTCA
MR112	pgk1_fw	ATCGACACCGACCATAGAGG
MR113	pgk1_rv	GTTTTTCCGATTCCCCAAAT
MR114	pgk1_q_rv	CGAGGCTTTCCGTAAGTCTTT
MR115	Kes1-qRv	TGCGGTAACATAAGCCTGTCA
MR116	cdr1-qfw	ATTAGGATGGCGCAACAAAC
MR117	cdr1-qRv	TGCCAAGCATGCTAAAACTG
MR118	vma3 fw	ctgggtacggatgtggattt
MR119	vma3rv	agccaaaccgactgacaaac
MR120	Vma3_qFw	tggctgtgtgttctgtcttga
MR121	Urg1_qRV	aagacgctaggggtaagatgg
MR122	ste9_q Fw	GCTGAACCCACCTGAGTGAT
MR123	ste9_qRv	TGCTTTGGCTTCTCGAGTTT

MR124	ste9 2d	ATGCCATACAAGCCATGACA
MR125	reb1 int1Fw	GTTTCCTCTTCCAACGACCA
MR126	reb1 int1Rv	GCTGTGTGTGGAGCAAAGAA
MR127	reb1 int2Fw	TCCAATGAATTTTACCACCA
MR128	reb1 int2Rv	TGGTCGTTGGAAGAGGAAAC
MR129	reb1 intAFw	GATTTAGGAAGGGTGGGA
MR130	reb1 intARv	GAGTTTTTTTGTACTAAGTG
MR131	reb1 intAFw2	AATCCACGCCAATAAATCCA
MR132	Reb sond1	TTTCCTGCCCAAATTTGATT
MR133	Reb sond1	TAAGGAAATGCAGCGTGTCTG
MR134	Reb sond2	TCGCCAATAACTAGAAATGCAA
MR135	Reb sond2	AAAAAGCTTTCCCATCGTGA
MR136	pirt2(ars1)Fw	AACTCCTTAACCACTCGGACA
MR137	pirt2(ars1)Rv	CCTTGGGAGTCCGAAATGTA
MR138	pirt2(leu)Fw	ACCAAACATGTTGCTGGTGA
MR139	pirt2(leu)Rv	CGCTATCGCACAGAATCAAA
MR140	orphan SPAC11G7.01	CCAGAGCCAGCAGTCATGTA
MR141	orphan SPAC11G7.01	TCACGTACGGAATCTTGCTG
MR142	orphan SPAC11G7.01	GCAAACCTTTGGGATGACGAT
MR143	orphan SPAC11G7.01	GCGAATGTTTCAAGACACCA
MR144	urg1	AAGAACTCACATCGGCAACC
MR145	urg1	GGGTAATGCACCAGCTCAAT
MR146	cdc2fw	TCCATTATTTCCCGGTGACT
MR147	cdc2rv	CGTGACTCCAGGCCATACTT
MR148	cdc18fw	CTCCTAAAACCCCCAAAAGG
MR149	cdc18rv	GATTGCAAAAGGCGAGTAGC
MR150	cdc18rv2	TTGGCTCATAGCAGATGTCTG
MR151	cdc22fw	GTCTTGCCGATGCTTTCTTC
MR152	cdc22rv	GGCTGCGTGGTAAATTGTTT
MR153	cdc22rv2	CAAGCCTCAGGGTTCTTGAT
MR154	cig2Fw	GCCACGTCGAACTGTCCTAT
MR155	Cig2Rv	TCGAACGATCTTTTCGCTTT

MR156	Cig2Rv2	TGAGTATCGTTGACGGACGA
MR157	cdt1Fw	TTTCAAAAGCTTTGCCTGCT
MR158	cdt1Rv	CGCAAGTATGGTTTCCCATT
MR159	cdt1Fw2	ACCAAACCAACCTTTGTGCT
MR160	ste11Fw	GCTGGAAAATCCCGAATACA
MR161	ste11Rv	CCACAAAAGATCCGGAAGAA
MR162	ste11Rv2	TTCGTCGCTTCTCCAGGTAT
MR163	fbp1 fw	CATTGGTTTATCGGGAATCG
MR164	fbp1 Rv	CGTTCGACTTCATCGCAGTA
MR165	cgs1 fw	CAGTGAGAAATGCGACGGTA
MR166	cgs1rv	AAATCGATCGCGTTACCAAG
MR167	cdt1(2)Rv	TGACTCTGGCCATACGGTTA
MR168	cbf11 fw	AGCTTATTCGGGCAAGCTAA
MR169	cbf11 rv	GCAAATGGCTTTAGTCCACA
otros	CtrSteFw	GCTTCGTTATTACGTAATCAA
otros	CtrSteRev	TTCAATTAACGTGCG TCCGT
otros	ChSte9Fw	CTTTCGCTTAAAGTCCAACC
otros	ChSte9Rev	GACTTCACCGATTAAATGTC
otros	DoRev Rv	GCGCGAATTCGTTCAAAAAATTGTAAGGAC
otros	Pste9Rv	AGCATACGACCAGCATCCTT
otros	NB2	GTTTAAACGAGCTCGAATTC
otros	pIRT2leu2(do)	TCCCATAATGGTGAAAGTTCC
otros	pIRT2-ars1(up)	CTGATGGAGGACTCGATTTAATG
otros	CtrSteFw	GCTTCGTTATTACGTAATCAA
otros	CtrSteRev	TTCAATTAACGTGCG TCCGT